

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



**Avaliação da Atividade Antimicrobiana de
Metabolitos Secundários Isolados a Partir de uma
Planta usada na medicina Tradicional Africana**

Shirley Arnie dos Reis Sancha

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



**Avaliação da Atividade Antimicrobiana de
Metabolitos Secundários Isolados a partir de uma
Planta usada na medicina Tradicional Africana**

Shirley Arnie dos Reis Sancha

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Ana Margarida Madureira

Professora Doutora Maria José Umbelino Ferreira

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2015

Resumo

Esta dissertação teve como principal objetivo a identificação de compostos com atividade antibacteriana e antifúngica, isolados a partir da planta medicinal Africana *Cleistochlamys kirkii* permitindo assim a validação científica da sua aplicação no tratamento de doenças infecciosas, na medicina tradicional Moçambicana.

Para tal, recolheu-se a parte da planta usada pelas populações – casca da raiz – e procedeu-se ao estudo fitoquímico bioguiado do extrato metanólico. Da fração do extrato metanólico solúvel em diclorometano, foi isolado um novo composto com um esqueleto derivado do ciclohexeno, designando por kikiinol (**2.5**). Isolaram-se ainda: uma flavanona, a pinostrobinina (**2.1**); três flavanonas C-benziladas, a dichamanetina (**2.2**), isochamanetina (**2.3**) e a *epi*-feligrina-A (**2.4**); dois derivados do heptano, o (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) e um composto novo designado por cleistonol (**2.7**); três triterpenos, o policarpol (**2.8**), o cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (**2.9**) e o 24-metilenocicloartanol (**2.10**); um esteroide, a β -sitostenona (**2.11**); uma antraquinona, o physcian (**2.12**) e a butirolactama (**2.13**).

Os compostos **2.1-2.13** foram ensaiadas num painel de estirpes de bactérias Gram-positivas nomeadamente *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA e VISA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e em estirpes de bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). A dichamanetina (**2.2**) e a isochamanetina (**2.3**) foram bastante ativas em todas as estirpes Gram-positivas testadas, com CMI que variam entre 1 e 15 $\mu\text{g/mL}$. O derivado do heptano (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) também apresentou atividade antibacteriana relevante nas estirpes ensaiadas, com valores de CMI que variam entre 15 e 62 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade antifúngica foi avaliada em doze espécies de fungos: seis espécies de *Candida* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* FFUL 21, *C. glabrata* FFUL 12B, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. kruzei* ATCC 6258 e *C. parapsilopsis* ATCC 90018); *Rhodotorula rubra* FFUL190; *Trichosporon cutaneum* FFUL 18H, *Saccharomyces cerevisiae* FFUL 1997, *Cryptococcus neoformans* FFUL 948 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. Os compostos isolados (**2.1-2.13**), apresentaram atividade antifúngica em uma ou mais espécies de fungos. A dichamanetina (**2.2**) e a chamanetina (**2.21**) foram os mais ativos CMI entre 4 e 62 $\mu\text{g/mL}$ nas espécies, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Aspergillus niger*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* e *C. tropicalis*.

O efeito sobre o valor das CMI de antibióticos, quando usados em combinação com vários compostos descritos nesta dissertação, foi avaliado pelo método do *checkerboard*. O policarpol (**2.8**) (CMI 125 $\mu\text{g/mL}$) apresentou efeito sinérgico na estirpe MRSA ATCC 9144. Quando combinado com a oxacilina, reduziu 83 vezes o valor da CMI (FICI = 0,11), enquanto com a amoxicilina reduziu 33 vezes o valor da CMI FICI = 0,18). Foi também obtido efeito sinérgico quando se combinou este composto com os antibióticos β -lactâmicos referidos (FICI = 0.30) e com a vancomicina (FICI = 0.24) na estirpe VISA CIP 106760. O composto **2.8**, também exibiu sinergismo quando combinado com a dichamanetina (**2.2**).

Observou-se também um efeito sinérgico com alguns derivados da dichamanetina (**2.16-2.20** e **2.24-2.26**), preparados anteriormente. Destes derivados, o composto **2.20** apresentou sinergismo em todas as estirpes e combinações ensaiadas. O composto **2.18** (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$) apresentou o melhor efeito sinérgico na estirpe VISA CIP 106414. Quando combinado com a oxacilina (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$), o composto **2.18** reduziu a CMI para 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.15), enquanto para a amoxicilina (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a CMI para 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.12).

Estes resultados sugerem que os compostos obtidos de *C. kirkii* poderão constituir protótipos promissores como agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Cleistochlamys kirkii*, *Annonaceae*, *Staphylococcus aureus*, flavanonas C-benziladas, policarpol, derivados do heptano, derivados do ciclo-hexeno, derivados da dichamanetina, sinergismo.

Abstract

The main aim of this work was to find antibacterial and antifungal lead compounds from the African medicinal plant *Cleistocholelamys kirkii* and provide scientific validation for its use in traditional medicine in Mozambique, for the treatment of infectious diseases.

To achieve this goal, the root bark used by native populations was collected and a bioassay-guided phytochemical study was performed on the methanol extract. From the dichloromethane soluble fraction of the methanol extract, a new compound was isolated with an unusual cyclohexene scaffold, named kirkiinol (**2.5**); one flavanone, pinostrobin (**2.1**), tree C-benzylated flavanones, dichamanetin (**2.2**), isochamanetin (**2.3**) and epi-phelligrin-A (**2.4**); heptane derivatives, (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) and a new compound, named cleistonol (**2.7**) three triterpene, polycarpol (**2.8**), cycloart-25-ene-3 β ,24-diol (**2.9**), and 24-metilenecycloartanol (**2.10**); one steroid, β -sitostenone (**2.11**); one anthraquinone, physician (**2.12**); and one butyrolactam (**2.13**).

Compounds **2.1-2.13** were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity against a panel of Gram-positive strains of *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA and VISA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and two Gram-negative bacteria strains, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Dichamanetin (**2.2**) and isochamanetin (**2.3**), were very active against all the Gram-positive strains tested, displaying MIC values in the range of 1-15 $\mu\text{g/mL}$. The heptane derivative, (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol also showed relevant antibacterial activity against some of the Gram-positive strains assayed, displaying MIC values between 15 and 62 $\mu\text{g/mL}$.

The antifungal activity was performed against twelve fungi species, namely: six *Candida* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* FFUL 21, *C. glabrata* FFUL 12B, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. kruzei* ATCC 6258 and *C. parapsilopsis* ATCC 90018); *Rhodotorula rubra* FFUL190; *Trichosporon cutaneum* FFUL 18H; *Saccharomyces cerevisiae* FFUL 1997; *Cryptococcus neoformans* FFUL 948 and *Aspergillus niger* ATCC 16404. The compounds isolated (**2.1-2.13**) showed antifungal activity in one or more fungal species.

Dichamanetin (**2.2**) and chamanetin (**2.21**) were the most active with MIC values between 4 and 62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Aspergillus niger*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* and *C. tropicalis*.

A chemosensitization assay, using the checkerboard method, was also performed in order to evaluate the type of interaction of compounds with antibiotics. Polycarpol (**2.8**) (MIC 125 $\mu\text{g/mL}$) showed a synergistic effect against MRSA ATCC 9144. When combined with oxacillin reduced 83-fold the value of MIC (FICI = 0.11). Similarly, it reduced 33-fold the value of amoxicillin MIC (FICI = 0.18). Synergy was also obtained when this compound was combined with both β -lactam antibiotics (FICI = 0.30) and also with vancomycin (FICI = 0.24) against vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) CIP 106760. Remarkable, compound **2.8** was also able to reduce synergistically the MIC value of dichamanetin (**2.2**) (FICI = 0.18).

Moreover, some dichamanetin derivatives (**2.16-2.20** and **2.24-2.26**), previously prepared, have also exhibited synergy. Compound **2.20** was the most active displaying a significant synergism against all the strains assayed. The best results against VISA CIP 106414 were obtained for compound **2.18**. When combined with oxacillin (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$), compound **2.18** reduced the MIC to 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.15). Similarly, it reduced the MIC of amoxicillin (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$) to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.12).

These results suggest that *C. kirkii* constituents may be valuable as a leads for restoring antimicrobial activity.

Keywords: *Cleistocholelamys kirkii*, *Annonaceae*, *Staphylococcus aureus*, C-benzylated flavanones, polycarpol, heptane derivatives, cyclohexene derivatives, dichamanetin derivatives, synergism

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me deu forças para conseguir alcançar este objetivo tão desejado e concretizado com muito esforço. Agradeço-lhe por ter encontrado pessoas fantásticas que me ajudaram a realizar este sonho aos quais expresso os meus sinceros agradecimentos:

À Doutora Ana Margarida Madureira, agradeço pela orientação deste trabalho, pelo apoio, dedicação, acompanhamento e disponibilidade prestada, que se revelaram determinantes para o bom termo desta pesquisa.

À Professora Doutora Maria José Umbelino Ferreira, um exemplo de competência e dedicação, agradeço a sua prestabilidade, compreensão e orientação, que foram determinantes para nunca me deixar ir abaixo mantendo-me no caminho certo.

À Professora Doutora Aida Duarte pela disponibilização do seu laboratório onde foram executados os ensaios biológicos, demonstrando sempre disponibilidade e atenção.

Ao Doutor Silva Mulhovo do Departamento de Ciências Agropecuárias da Universidade Pedagógica de Maputo, pelo apoio prestado na recolha e envio da planta para este estudo.

A todo grupo de trabalho NatProdChem, especialmente, Angela Paterna, Mariana Reis, Andreia Mónico e Jorge Silva, agradeço todo o apoio, amizade e disposição proporcionados ao longo de todo o ano e que contribuíram para o bom ambiente que se verificou no laboratório.

A todas as pessoas com quem convivi no laboratório durante este último ano, pela amizade e simpatia que transmitiram.

Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio e paciência que demonstraram ao longo deste tempo, especialmente a minha tia Lúcia Dias e meu primo Dénnis Fonseca pela força, carinho e apoio incondicional.

Obrigada pelo carinho, afeto e força que sempre me deram para concluir esta etapa da minha vida.

Abreviaturas e Simbologia

AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type culture collection
BAS	β -amirina síntase
cf.	Confronte
CAS	Cicloartenol síntase
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona síntase
CIP	Collection of Institut Pasteur
CM	Concentração mínima inibitória
CoA	Coenzima A
COSY	Correlação próton-próton (Correlation Spectroscopy)
CO₂	Dióxido carbono
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	Duplo duplete
<i>DEPT</i>	Espetro de carbono 13 com seleção de carbonos (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DMAPP-	Dimetilalil di-fosfato
DXP-	Desoxi-D-xilulose-5-fosfato
<i>et al</i>	e outros (autores)
FICI	Índice de concentração mínima inibitória fracional
HMBC	Heterocorrelação ¹ H, ¹³ C a duas ou três ligações (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HSQC	Heterocorrelação ^1H , ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
IDH	Índice de deficiência de hidrogénios
IPP	Isopentenil-difosfato
FTIR	Infravermelho (Fourier transform infrared spectroscopy)
FPP	Pirofosfato farnesil
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
MVA	Ácido mevalónico
NCS	Norclaurina síntase
ppm	Parte por milhão
ref.	Referência (s)
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	singuleto
SQE	Esqualeno monoxigenase
SQS	Esqualeno síntase
<i>t</i>	Triplete
<i>td</i>	Triplete de dupletos
TLC	Cromatografia de camada fina (Thin layer chromatography)
UV	Ultravioleta
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina

v/v	Volume por volume
δ_H	Deslocamento químico no espectro ^1H RMN
δ_C	Deslocamento químico no espectro ^{13}C RMN

Índice Geral

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Abreviatura e Simbologia.....	iv
Índice de Figuras.....	x
Índice de Esquemas.....	xii
Índice de Tabelas.....	xii
1.Introdução.....	1
1.1 A família <i>Annonaceae</i>	3
1.2 O género <i>Cleistochlamys</i>	4
1.3 Principais metabolitos secundários da tribo <i>Uvarieae</i>	5
1.3.1 Alcaloides.....	5
1.3.2 Flavonoides	10
1.3.3 Derivados do ciclo-hexeno.....	14
1.3.4 Derivados do heptano.....	18
1.3.5. Triterpenos	20
1.3.6 Acetogeninas	23
1.3.7 Outras estruturas.....	24
1.4. Doenças infecciosas na sociedade atual	26
1.4.1. O <i>Staphylococcus aureus</i>	27
1.4.2. Fungos	29
2. Apresentação e discussão dos resultados	32
2.1. Estudo fitoquímico de <i>Cleistochlamys kirkii</i>	32
2.1.1. Flavanonas	33
2.1.1.1. Pinostrobina.....	33

2.1.2 Flavanonas C-benziladas	36
2.1.2.1. Dichamanetina.....	36
2.1.2.2. Isochamanetina.....	39
2.1.2.3. <i>Epi</i> -feligrina A.....	42
2.1.3. Derivados de ciclo-hexeno.....	44
2.1.3.1. Kirkiinol	44
2.1.4. Derivados do heptano	48
2.1.4.1 (<i>R</i>)-(<i>E</i>)-Acetilmelodorinol.....	48
2.1.4.2. Cleistonol	50
2.1.5. Triterpenos	53
2.1.5.1. Policarpol	53
2.1.5.2. Derivados do esqueleto cicloartano.....	56
2.1.5.3. β -sitostenona	58
2.1.6 Outras estruturas	61
2.1.6.1. Physcian	61
2.1.6.2 Butirolactama	63
2.2. Atividade antibacteriana	65
2.2.1. Determinação da concentração mínima inibitória dos compostos isolados..	66
2.2.2. Avaliação da interação entre os compostos obtidos e alguns antibióticos de referência.....	69
2.2.2.1. Compostos de origem natural.....	71
2.2.2.2 Compostos de síntese derivados da dichamanetina.....	75
2.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	81
3. Conclusões.....	87
4. Procedimento experimental	91
4.1. Instrumentação e técnicas gerais.....	91
4.2. Estudo fitoquímico de <i>Cleistochlamys kirkii</i>	91

4.2.1. Estudo da fração B do extrato de diclorometano	92
4.2.1.1. Estudo da fração B ₅	93
4.2.1.2. Estudo da fração B ₂	94
4.2.1.2.1. Estudo da fração B _{2B2}	95
4.2.1.2.2. Estudo da fração B _{2B3}	96
4.2.1.3. Estudo da fração B ₃	96
4.2.1.4. Estudo da fração B ₄	97
4.2.1.5. Estudo da fração M	100
4.2.1.5.1. Estudo da fração M _{5A}	100
4.2.1.5.2. Estudo da fração M ₄	102
4.2.1.6. Estudo da Fração O	103
4.2.1.6.1. Estudo da fração O _{2D}	105
4.2.1.7. Estudo da Fração N.	107
4.2.1.7.1. Estudo da fração N ₅	108
4.2.1.7.2. Estudo da fração N _{5B}	108
4.2.1.7.3. Estudo da fração N ₆	109
4.3. Avaliação da atividade antibacteriana	110
4.3.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	110
4.3.2. Determinação do índice da concentração inibitória fracional (FICI)	111
4.4. Avaliação da atividade antifúngica	111
4.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória	112
5. Referências Bibliográficas	113

Índice de figuras:

Figura 1.1: Estrutura da morfina e de outros compostos isolados.....	2
Figura 1.2 : Frutos comestíveis na família <i>Annonaceae</i> : A) anona (<i>Annona squamosa</i>) ^a , B) <i>Polyalthia nitidissima</i>	3
Figura 1.3: Aspectos botânicos da espécie <i>Cleistochlamys kirkii</i> ^l	4
Figura 1.4: Estrutura dos alcaloides benzilisoquinólicos.	6
Figura 1.5: Alguns exemplos de alcaloides benzilisoquinolínicos.....	6
Figura 1.6: Via biossintética de formação dos alcaloides benzilisoquinolínicos	7
Figura 1.7: Via biossintética de formação das aristolactamas.....	9
Figura 1.8: Estrutura nuclear dos flavanóides e dos subgrupos em que se encontram divididos.	11
Figura 1.9: Via biossintética da formação das flavanonas (CHS, chalcona síntase, CHI chalcona isomerase).....	12
Figura 1.10: Estruturas representativas dos ciclo-hexenos polioxigenados (uvarigranol), monoepóxidos do ciclo-hexeno ((+)- padoxide) e dos bisepóxidos do ciclo-hexeno (3R- crotepoxide).	15
Figura 1.11: Via biossintética de formação dos ciclo-hexenos.	16
Figura 1.12: Via biossintética de formação dos derivados de heptano.	19
Figura 1.13: Biossíntese dos triterpenos através da via do mevalonato (IPP- difosfato de isopentil, DMAPP- difosfato dimetilalil, FPS-pirofosfato farnesil síntase, FPP- pirofosfato farnesil, SQS- esqualeno síntase, SQE-esqualeno monooxigenase, CAS- cicloartenol síntase, BAS- β - amirina síntase).	21
Figura 1.14: Estruturas exemplificativas de cada uma das classes das acetogeninas.....	23
Figura 1.15: Acetogeninas identificadas nos últimos anos na tribo <i>Uvarieae</i>	24
Figura 1.16: Estruturas representativas da penicilina G, metilicina e vancomicina....	28
Figura 1.17: Estrutura de alguns agentes antifúngicos usados e terapêutica.....	30
Figura 2.1: Estrutura dos compostos isolados de <i>Cleistochlamys kirkii</i>	33

Figura 2.2: Estrutura de ressonância da ligação de hidrogénio estabelecida entre o oxigénio do grupo carbonilo na posição 4 e hidrogénio do grupo hidroxilo da posição 5.	35
Figura 2.3: Correlações visíveis no espectro de HMBC que permitem relacionarem o anel C com os anéis A e B	35
Figura 2.4: Fragmentos estruturais estabelecidos através da experiência de ^1H - ^1H COSY do composto 2.2 .	35
Figura 2.5: Correlações no espectro de HMBC que permitem verificarem a ligação dos grupos metilenos, H_{11} e H_{12} , em relação ao anel A do composto 2.2	39
Figura 2.6: Correlações observadas no espectro de HMBC que permitiu definir a posição do hidroxilo no anel aromático dos grupos benzilo do composto 2.2	39
Figura 2.7: Correlações no espectro de HMBC que permite verificar a ligação do grupo metileno H_{11} em relação ao anel A do composto 2.3 .	41
Figura 2.8: Fragmentos estruturais estabelecidos através da experiência ^1H - ^1H COSY e correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram definir a posição do hidroxilo no anel aromático do grupo benzilo.	42
Figura 2.9: Fragmentos estruturais do composto 2.3 , estabelecidos através da experiência ^1H - ^1H COSY e correlações observadas no espectro de HMBC, que permitiram caracterizar a estrutura do anel B.	44
Figura 2.10: Efeito de ressonância verificado entre o anel aromático e o grupo carbonilo.	45
Figura 2.11: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência ^1H - ^1H COSY do composto 2.5 .	45
Figura 2.12: Principais correlações observadas no espectro de HMBC para o composto 2.5 .	47
Figura 2.13: Correlações observadas no espectro de NOESY, e valores de constantes de acoplamento, espectro de ^1H -RMN do composto 2.5 .	47
Figura 2.14: Ressonância da dupla ligação com o grupo carbonilo da lactona.	49

Figura 2.15: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência de ^1H - ^1H COSY do composto 2.6	50
Figura 2.16: Correlações mais importantes observadas no espectro de HMBC do composto 2.6	50
Figura 2.17: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência de COSY do composto 2.7	52
Figura 2.18: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto 2.7	53
Figura 2.19: Acoplamentos observados no espectro ^1H -RMN entre H_2 e H_3	54
Figura 2.20: Fragmentos estruturais estabelecidos através das experiências de ^1H - ^1H COSY e HMQC do composto 2.8	56
Figura 2.21: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto 2.11	63
Figura 2.22: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto 2.12	63
Figura 2.23: Fragmentos estruturais estabelecidos através das experiências de ^1H - ^1H COSY e HMQC do composto 2.13	64
Figura 2.24: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto 2.13	64
Figura 2.25: Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	65

Índice de esquemas:

Esquema 4.1: Metodologia da extração de <i>Cleistochlamis kirkii</i>	92.
Esquema 4.2: Estudo da fração B; obtenção dos compostos 2.1 , 2.9 , 2.10 , 2.11 e 2.12	99
Esquema 4.3: Estudo da fração M, obtenção dos compostos 2.2 , 2.4 e 2.5	103
Esquema 4.4: Estudo da fração O: obtenção dos compostos 2.3 , 2.6 e 2.8	107

Índice de tabelas:

Tabela 1.1 : Novos alcaloides benzilisoquinolinos isolados a partir de espécies da tribo <i>Uvarieae</i> nos últimos anos.....	8
Tabela 1.2: Novs aristolactamas isolados de espécies da tribo <i>Uvarieae</i> nos últimos anos.....	9
Tabela 1.3: Flavonóides isolados de espécies da tribo <i>Uvarieae</i> nos últimos anos.	13
Tabela 1.4: Novos ciclo-hexenos isolados de espécies da tribo <i>Uvarieae</i> nos últimos anos.....	17
Tabela 1.5: Compostos derivados do heptano isolados nos últimos anos.....	20
Tabela 1.6: Triterpenos isolados na tribo <i>uvarieae</i> nos últimos anos.....	22
Tabela 1.7: Outras estruturas de metabolitos secundários isolados na tribo <i>Uvariae</i>	25
Tabela 2.1: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.1	35
Tabela 2.2: Espectros de ^1H , ^{13}C - RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.2	37
Tabela 2.3: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.3	41
Tabela 2.4: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.3.	43
Tabela 2.5: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.5.	46
Tabela 2.6: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.6	49
Tabela 2.7: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.7	51

Tabela 2.8: Principais diferenças entre os compostos 2.6 e 2.7 no espectro de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)].	52
Tabela 2.9: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.8	55
Tabela 2.10: Espectros de RMN ^1H [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] dos compostos 2.9 e 2.10	57
Tabela 2.11: Principais diferenças nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] dos compostos 2.9 e 2.10	57
Tabela 2.12: Espectros de ^{13}C -RMN e DEPT [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.9 e 2.10	58
Tabela 2.13: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.11	60
Tabela 2.14: Espectros de ^1H , ^{13}C - RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.12	62
Tabela 2.15: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto 2.13	64
Tabela 2.16: Concentração mínima inibitória (CMI $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos compostos isolados de <i>C. Kikii</i>	68
Tabela 2.17: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos isolados e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe sensível <i>S. aureus</i> ATCC 6538.	72
Tabela 2.18: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos isolados e índice da concentração inibitória fracional (FICI) nas estirpes <i>S. aureus</i> resistentes (ATCC 9144 e CIP 106414).....	74
Tabela 2.19: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe sensível <i>S. aureus</i> ATCC 6538.	75

Tabela 2.20: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados da com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na a estirpe resistente <i>S. aureus</i> ATCC 9144.....	79
Tabela 2.21: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados da com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe resistente <i>S. aureus</i> CIP 106414.	80
Tabela 2.22: Resultados obtidos do cálculo de Log P dos derivados de síntese da dichamanetina.....	81
Tabela 2.23: Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos isolados em algumas espécies de fungos.....	85
Tabela 4.1: Frações da cromatografia em coluna da fração E-G do extrato de diclorometano.....	93
Tabela 4.2: Cromatografia da fração B _{2B} resultante da fração B ₂	95
Tabela 4.3: Cromatografia da fração M _{5A}	100
Tabela 4.4: Cromatografia da fração O ₂	104
Tabela 4.5: Cromatografia da fração N.	107
Tabela 4.6: Cromatografia da fração N ₅	108

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

A natureza tem sido usada pelo Homem desde tempos imemoriais para suprimir as suas necessidades fundamentais, nomeadamente como base para o tratamento de doenças (Cragg e Newman, 2013). Desde sempre o homem utiliza plantas no alívio da dor; atribuiu-lhes poderes mágicos e foi aprendendo a identificar as suas propriedades. Hoje em dia, podemos desfrutar dos benefícios da fitoterapia graças aos nossos antepassados que, ao longo de milhares de anos, descobriram as plantas que possuíam propriedades medicinais e identificaram as plantas tóxicas (Ji, *et al.*, 2009).

Não é por acaso que os produtos naturais estão sempre presentes na investigação farmacológica. São fontes inesgotáveis de compostos com atividade biológica diversa, constituindo protótipos para o desenvolvimento da maioria dos fármacos atualmente usados em terapêutica. Estes compostos, incluídos nos metabolitos secundários, são moléculas que as plantas produzem para controlar o seu meio ambiente, sobreviverem e reproduzirem-se. Algumas destas moléculas desempenham *in vivo* diversas funções, como proteção da planta contra raios UV, variações térmicas e defesa contra infeções e predadores. (Dewick, 2009^a, Cragg e Newman, 2013).

Ao longo dos anos, tem sido utilizado um grande número de compostos extraídos a partir de animais, plantas e microrganismos para o tratamento de doenças. Em 1805, o jovem farmacêutico alemão, Friedrich Wilhelm Sertürner (1783 – 1841), isolou, de *Lachryma papaveris* (ópio), e identificou pela primeira vez a morfina (Figura 1.1), tornando-se no primeiro composto natural puro a ser isolado e comercializado pela Merck no ano de 1826, como um potente fármaco analgésico (Ji, *et al.*, 2009). Após o isolamento da morfina, vários outros metabolitos foram isolados e identificados como a salicina, a partir da *Salix alba* (salgueiro branco), a quinina, da *Cinchona ledgeriana* (casca da cinchona), a cafeína da *Coffea arabica*, a nicotina da *Nicotiana tabacum*, a atropina da *Atropa belladonna* e a cocaína da *Erythroxylum coca* (Figura 1.1), tratando-se apenas de alguns dos metabolitos mais importantes com atividade farmacológica relevante (Khazir, *et al.*, 2013)

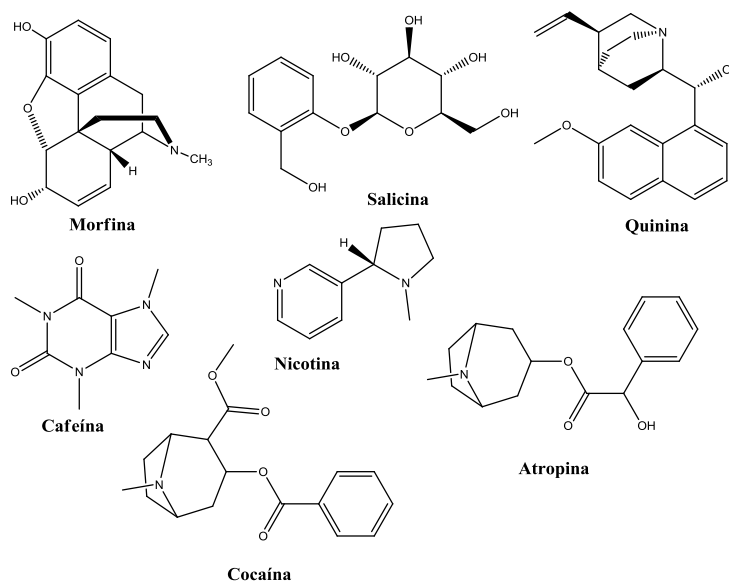


Figura 1.1: Estrutura da morfina e de outros compostos isolados.

No entanto, a descoberta de novas moléculas e o rápido desenvolvimento de fármacos inovadores continua a ser uma necessidade imperiosa nos nossos dias. Neste campo, a investigação deve prosseguir incansavelmente, uma vez que o Homem ainda está desarmado perante um grande número de doenças. Nesta incessante busca, tem havido um aumento de interesse da comunidade científica nos produtos naturais. As modernas ferramentas disponibilizadas pela Química e Biologia, mais concretamente o aparecimento das tecnologias “ómicas”, têm permitido conhecer a natureza dos efeitos biológicos executados por esses compostos no corpo humano (Ji, *et al.*, 2009).

Os produtos naturais também desempenham um papel importante na identificação e desenvolvimento de compostos que apresentam efeitos sinérgicos e que até agora foram negligenciados. Alguns compostos têm a capacidade de se ligar a diversas proteínas, pois ambas, proteínas e produtos naturais, são estruturas flexíveis que têm a capacidade de adaptar a sua configuração. De realçar que os compostos naturais dispõem de diversos grupos funcionais de ligação, mas apenas alguns deles são suficientes para se ligarem no alvo (Ji, *et al.*, 2009).

Os metabolitos secundários característicos dos produtos naturais são extremamente numerosos e como as suas estruturas químicas são simultaneamente muito complexas e diversificadas, apresentam uma elevada seletividade e especificidade. (Cragg e Newman, 2013; Chen, *et al.*, 2015).

1.1 A família *Annonaceae*

A família *Annonaceae* pertence ao grupo das angiospérmicas (The Plant List, 2015) e é o maior e mais diversificado grupo de plantas na ordem das magnoliales, com aproximadamente 135 géneros e 2500 espécies. Devido à sua diversidade, esta família encontra-se dividida em quatro subfamílias: a *Anaxagoreoideae*, a *Ambavioideae*, a *Annonoideae* e a *Malmeoideae*, e em 14 tribos (Chatrou *et al.*, 2012).

As plantas da família *Annonaceae* apresentam uma morfologia heterogénea da qual fazem parte principalmente árvores, arbustos e trepadeiras que se encontram distribuídos pelas regiões tropicais, podendo-se encontrar algumas espécies nas regiões temperadas. Estas espécies apresentam uma grande importância a nível económico, pois são uma fonte de frutos comestíveis (Figura 1.2), óleos aromáticos e são muito utilizadas na medicina tradicional por apresentarem atividades como antibacteriana, antifúngica e anti-protozoária (Aminimoghadamfarouj, *et al.*, 2011).



Figura 1.2 : Frutos comestíveis na família *Annonaceae*: A) anona (*Annona squamosa*)^a, B) *Polyalthia nitidissima*^b.

Adaptado de:

^ahttp://www.tropicalfruitnursery.com/fruitproducts_sw.htm

^b<https://www.flickr.com/photos/micks-wildlife-macros/galleries/72157638855869553>

1.2 O género *Cleistochlamys*

O género *Cleistochlamys* pertence à tribo *Uvarieae*, incluída na subfamília *Annonoideae*, que por sua vez pertence à grande família *Annonaceae*. A planta *Cleistochlamys kirkii* é a única espécie do género *Cleistochlamys*. O *C. kirkii* é originário da Tanzânia e de Moçambique, mas também podemos encontrar esta planta em outros países vizinhos como o Maláui, Zâmbia e Zimbabué (Global Plants, 2015).

Morfologicamente, a espécie *C. kirkii* é um arbusto ou árvore pequena (até 10 metros), normalmente muito ramificada e dispersa, com folhas estreitas e longas, entre 6-11 cm. Apresenta flores de cor branca ou creme que aparecem após a queda das folhas. O fruto, comestível quando está maduro, tem uma forma cilíndrica de pequena dimensão (até 2,5 cm de diâmetro) e uma cor purpura, como se de uma azeitona se tratasse (Figura 1.3). É uma espécie que cresce em solos quentes e secos (Global Plants, 2015).

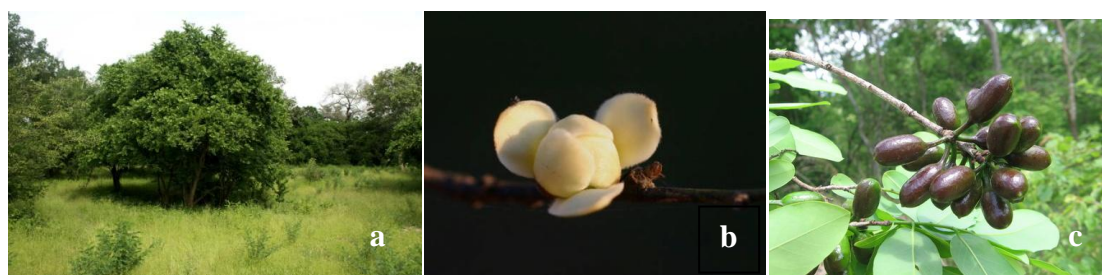


Figura 1.3: Aspetos botânicos da espécie *Cleistochlamys kirkii*.

Na medicina tradicional moçambicana, as folhas e raízes de *C. kirkii* são frequentemente preparadas como macerados em água e chás, que são administrados oralmente para combater dores de estômago, controlar o vômito durante a gravidez, dores musculares, fraqueza e tratamento de reumatismo, infeções e tuberculose (Bruschi, *et al.*, 2011; Ramesh e Meshram, 2011).

Adaptado de:

^a<http://annonaceae.myspecies.info/category/africanannonaceae/annonaceae/cleistochlamys/cleistochlamys-kirkii>.

^bhttp://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/imagedisplay.php?species_id=123800&image_id=10

^chttp://annonaceae.myspecies.info/sites/annonaceae.myspecies.info/files/IMG_1977TC63.jpg

1.3 Principais metabolitos secundários da tribo *Uvarieae*

Neste capítulo, apresenta-se uma revisão bibliográfica de novos compostos isolados nos últimos sete anos (2007-2015) relativa à tribo *Uvarieae* que é composta por dezasseis géneros, uma vez que o *C. kirkii* é a única espécie do género *Cleistochlamys*. Apresentam-se igualmente algumas características gerais, incluindo aspetos biossintéticos, de cada uma das principais classes de metabolitos secundários da tribo *Uvarieae*. As classes de metabolitos valorizadas foram os alcaloides, os flavonóides, os derivados do ciclo-hexeno, os derivados do heptano, os triterpenos e as acetogeninas.

Esta revisão bibliográfica foi realizada consultando a base de dados “ScienceDirect” e a plataforma de pesquisa “ISI Web of Knowledge”, no período compreendido entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2015 utilizaram-se como palavras-chave o nome dos quinze géneros da tribo *Uvarieae*: *Afroguatteria*, *Cleistochlamys*, *Dasymaschalon*, *Desmos*, *Dielsiothamnus*, *Exellia*, *Fissistigma*, *Friesodielsia*, *Gilbertiella*, *Melodorum*, *Monanthotaxis*, *Schefferomitra*, *Sphaerocoryne*, *Toussaintia* e *Uvaria*.

1.3.1 Alcalóides

Os alcaloides são moléculas produzidas principalmente em plantas e microrganismos. Esta classe de compostos naturais caracteriza-se por apresentar na sua estrutura um ou mais átomos de azoto que lhes conferem características essencialmente básicas. Estruturalmente, apresentam uma grande diversidade, incluindo uma enorme variedade de esqueletos, sendo conhecidas mais de 27000 estruturas distintas. Biossinteticamente, são compostos derivados de aminoácidos alifáticos, como é o caso da ornitina, arginina ou a lisina, e/ou aromáticos como a fenilalanina, tirosina ou o triptofano (^bDewick, 2009.; Minami *et al.*, 2008).

Os alcaloides apresentam inúmeras atividades biológicas, como antitumoral, antiviral, anti-hipertensiva, antidepressiva, antimicrobiana, antiemética, anti-inflamatória, diurética e simpatomimética (Do Nascimento *et al.*, 2015; Melendez-Camargo, *et al.*, 2014; Tohme, *et al.*, 2011).

A maioria dos alcaloides presentes na família *Annonaceae* apresenta estruturas derivadas dum esqueleto do tipo benzilisoquinolínico. As benzilisoquinolinas consistem um esqueleto de quatro anéis fundidos (Figura 1.4) podendo ser até hexa-substituídas

em todos os anéis por grupos hidroxilo, metoxilo, metilenodióxilo (este último substituinte aparece apenas nos anéis A e D), entre outros (^bDewick, 2009).

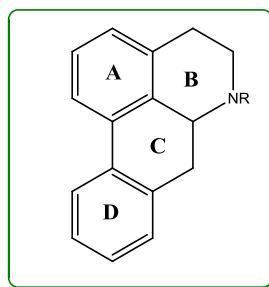


Figura 1.4: Estrutura dos alcaloides benzilisoquinólicos.

Dentro dos benzilisoquinolinos, incluem-se compostos como a tubocuramina, apomorfina, os analgésicos opiáceos como a codeína, morfina ou os compostos antibacterianos como a berberina, a palmatina e a magnoflarina entre outros (Figura 1.5) (Minami *et al.*, 2008).

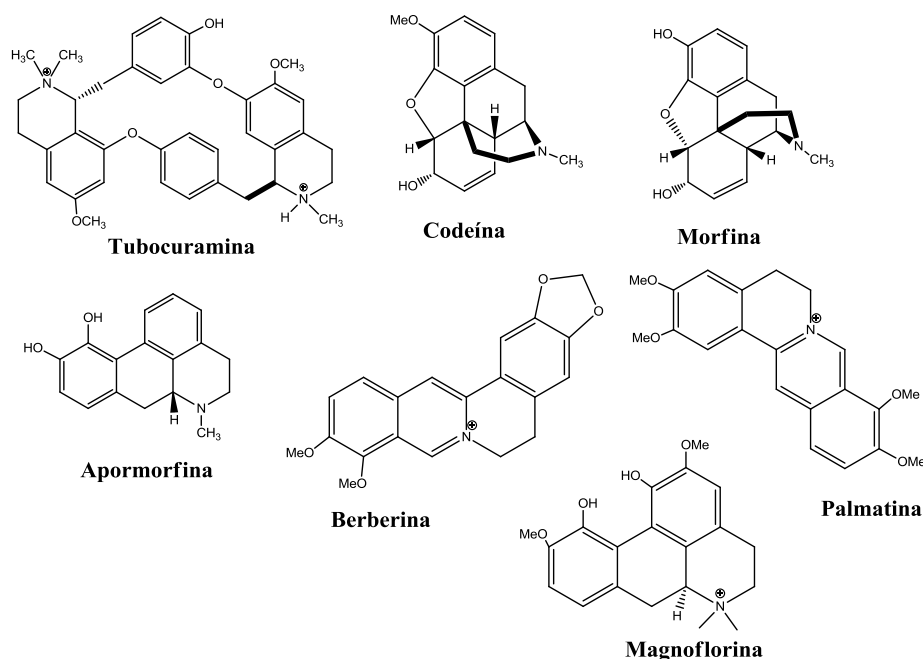


Figura 1.5: Alguns exemplos de alcaloides benzilisoquinólicos.

A biossíntese das benzilisoquinolinas inicia-se com uma reação de condensação catalisada pela norcoclaurina sintetase (NCS), entre a dopamina e o 3,4-dihidroxifenilacetaldeído, ambos derivados da tirosina (via xiquimato), originando a (*S*) - norlaudanosolina. A (*S*) - norlaudanosolina, após ser metilada (6OMT, 6-O-metiltransferase, e CNMT, coclaurina N-metiltransferase) é transformada na (*S*) - reticulina (Figura 1.6), a partir da qual se formam todos os alcaloides benzilisoquinolinos. Para completar a formação do alcaloide aporfínico é necessária a

formação da ponte carbono-carbono entre os dois fenóis, ou seja, uma reação de acoplamento fenólico oxidativo, catalisada pelo CYP80G2, uma enzima do citocromo P450 (Minami *et al.*, 2008; Sato e Kumagai, 2013).

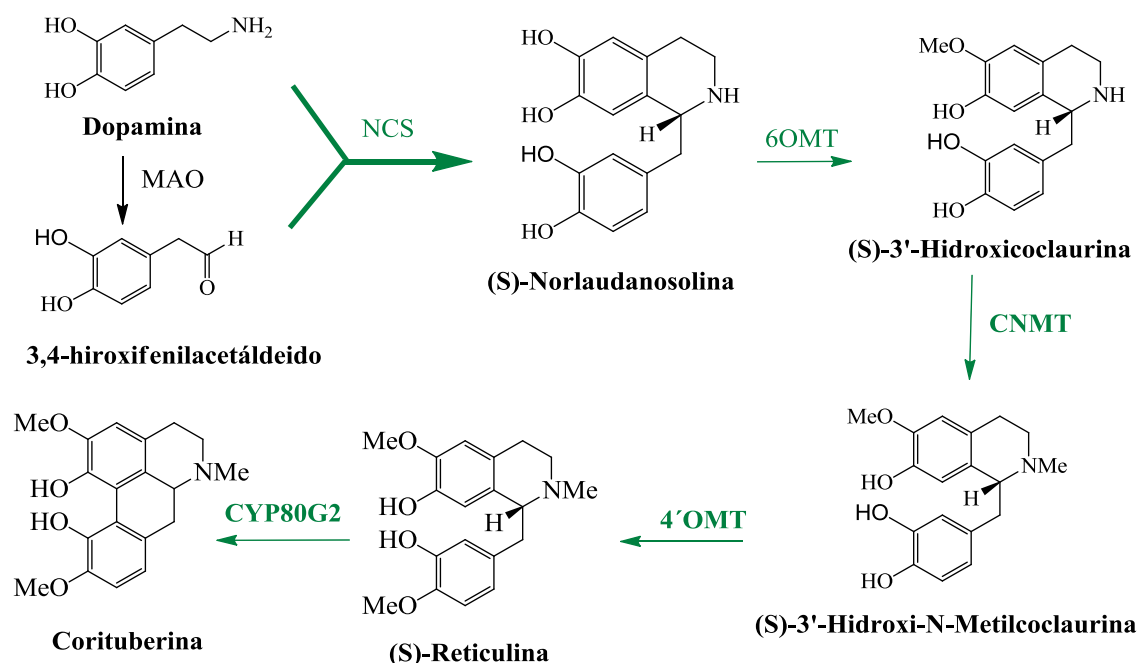
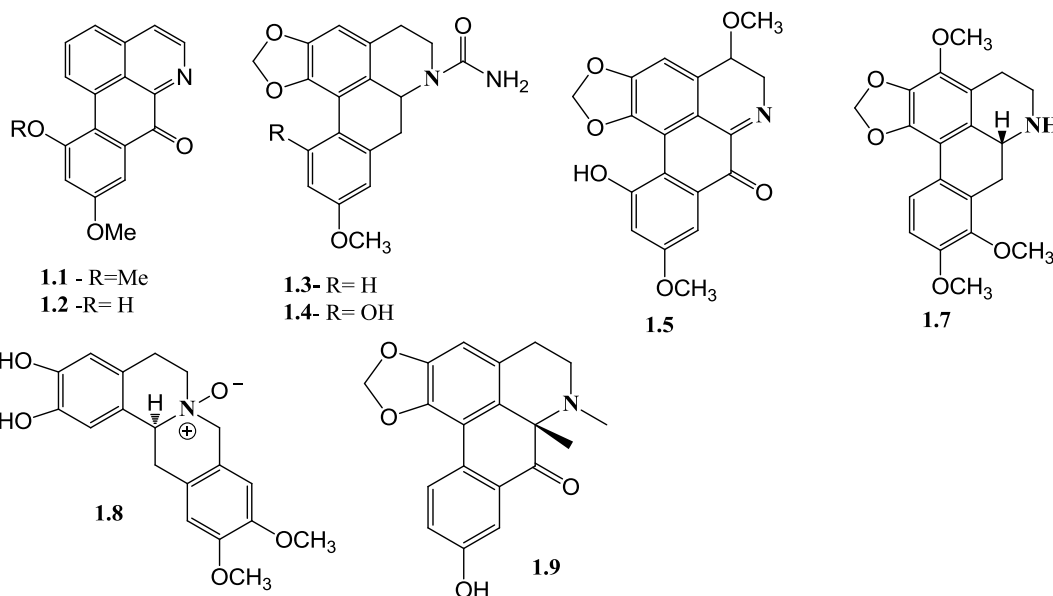


Figura 1.6: Via biossintética de formação dos alcaloides benzilisoquinólicos .

Nos últimos anos foram isoladas apenas oito estruturas novas de alcaloides benzilisoquinólicos (Tabela 1.1). A maior parte destas novas estruturas revelou ter uma importante atividade biológica como citotóxica, antimicrobiana e anti-inflamatória. No entanto, a atividade desta classe de compostos está fortemente relacionada com as suas propriedades antimalárica e antileishmaniose (Malebo *et al.*, 2013), anticancerígena (Thuy, *et al.*, 2012) e agonistas não seletivos dos recetores dopaminérgicos. Atualmente, as benzilisoquinólinas, nomeadamente a apomorfina (Figura 1.5) são utilizadas em indivíduos com doença de Parkinson avançada. Estudos recentes revelaram que este composto pode ter um papel importante no tratamento da doença de Alzheimer (Ribarič, 2012).

Tabela 1.1 : Novos alcaloides benzilisoquinolínicos isolados a partir de espécies da tribo *Uvarieae* nos últimos anos.

N °	Composto	Espécie	Atividades	Referência
1.1	Oxodiscoguatina	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Inibição da proliferação das células B e T	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
1.2	Oxocalicinina			
1.3	Fissistigamide A			
1.4	Fissistigamide B	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Atividade anti-inflamatória	(Ge <i>et al.</i> , 2013)
1.5	Fissistigmine			
1.6	Desmorostratine	<i>Desmos rostrata</i>	Atividade citotóxica em células KB	(Nguyen, <i>et al.</i> , 2008)
1.7	<i>N</i> -óxido de discretine		Atividade antiplasmodial em <i>P. falciparum</i>	
1.9	(-)- <i>N</i> -metilguatescidina	<i>Fissistigma latifolium</i>	-	(Alias <i>et al.</i> , 2010)



Um outro grupo de alcaloides presentes na família *Annonaceae* são as aristolactamas, que são um pequeno grupo de compostos que também estão presentes nas famílias *Monimimaceae*, *Menispermaceae*, *Piperaceae* e *Aristolochiaceae* (Kumar, *et al.*, 2003). A biossíntese das aristolactamas deriva de precursores benzilisoquinolínicos originados a partir da tirosina (via do xiquimato) (Figura 1.7).

Estes tipos de alcaloides resultam da clivagem oxidativa do anel benzilisoquinólico (Comer, *et al.*, 1969).

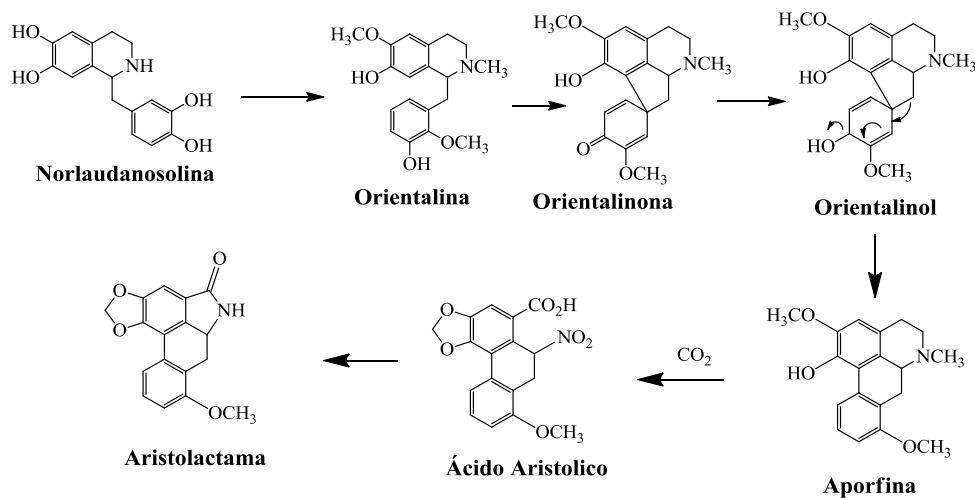
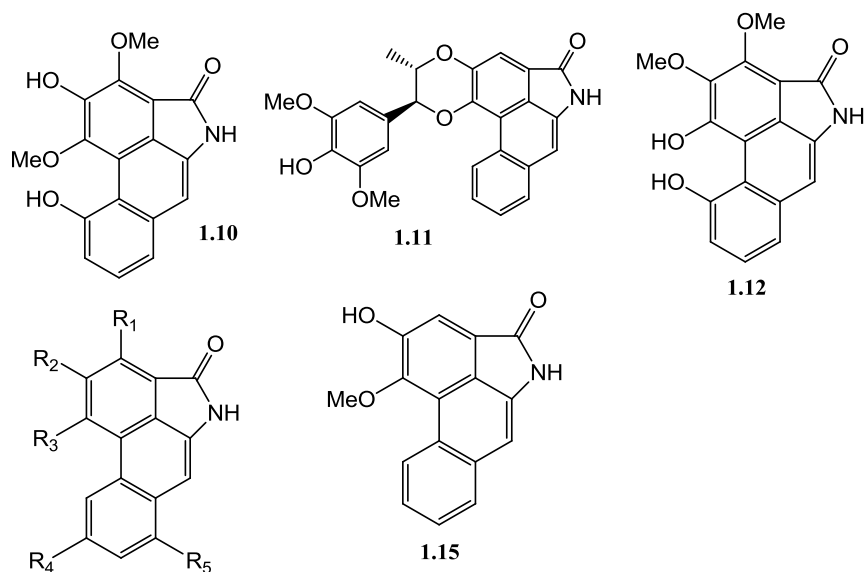


Figura 1.7: Via biossintética de formação das aristolactamas.

No período referido, foram isolados apenas algumas estruturas com esqueleto do tipo aristolactama. Destes, apenas os compostos **1.10** e **1.11** revelaram ter atividade biológica, nomeadamente atividade citotóxica e anti-inflamatória, respetivamente.

Tabela 1.2: Novas aristolactamas isolados de espécies da tribo *Uvarieae* nos últimos anos.

Nº	Composto	Espécie	Atividades	Referências
1.10	3,5-dihidroxi-2,4-dimetoxiaristolactama	<i>Dasymaschalon blumei</i>	Citotoxicidade contra linhas celulares tumorais	(Chanakul <i>et al.</i> , 2011)
1.11	Aristolactama GI	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Atividades anti-inflamatória	(Ge <i>et al.</i> , 2013)
1.12	Aristolactama GII			
1.13	3, 6-dihidroxi-2, 4-dimetoxiaristolactama	<i>Dasymaschalon trichophorum</i>	-	(Xiao-lei <i>et al.</i> , 2013)
1.14	Goniopedalina	<i>Uvaria microcarpa</i>	-	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
1.15	Aristolactama AII	<i>Desmos rostrata</i>	-	(Nguyen <i>et al.</i> , 2008)



1.13- R1=OMe, R2= OH, R3=OMe, R4= OH, R5=H

1.14- R1=OMe, R2= OH, R3= OMe, R4= H, R5= H

1.3.2 Flavonóides

Os flavonóides são um grupo de metabolitos secundários, produzidos pelas plantas, que desempenham funções essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento (Weston e Mathesius, 2013).

Estes compostos têm como base biossintética um esqueleto C6-C3-C6, que após ciclização da cadeia linear origina um esqueleto com uma estrutura de fenilbenzopirano, com os anéis A, B e C, presentes na maioria dos flavanóides, com exceção das auronas e chalconas onde a estrutura C6-C3-C6 se mantém (Figura 1.8). Esta classe de compostos está dividida em seis subgrupos, de acordo com as especificidades estruturais de cada um dos esqueletos base que os constituem (Dewick, 2009):

- As chalconas, compostos com uma cetona aromática alfa-beta insaturada;
- As auronas;
- As flavonas, compostos insaturadas $\Delta^{3,4}$;
- Os flavonóis, compostos insaturados $\Delta^{3,4}$ e hidroxilados na posição 3;
- As flavanonas, compostos saturados nas posições 2 e 3;
- Os di-hidroflavonóis, flavanonas com um grupo hidroxilo na posição 3;
- As antocianinas, compostos insaturados, sem grupo carbonilo e com um oxocatião;
- Os isoflavonóides, compostos em que o anel benzénico se encontra na posição 3

- Os flavanos, compostos que não contém o grupo carbonilo e são saturados nas posições 2, 3 e 4.

Esta classe de compostos encontra-se largamente distribuída pela família *Annonaceae* e é bastante conhecida pela forte atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana dos compostos que a constituem (Weston e Mathesius, 2013).

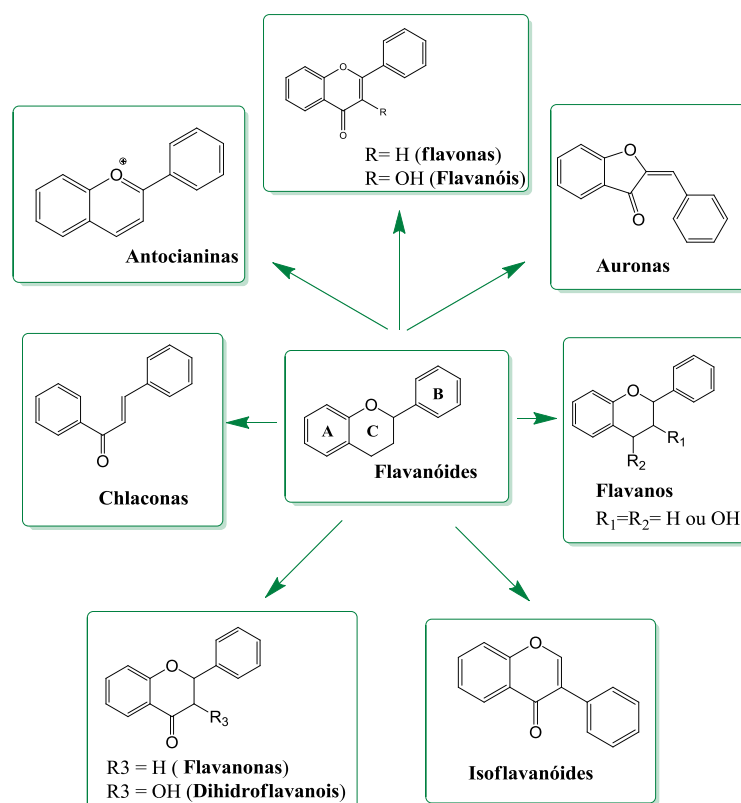


Figura 1.8: Estrutura nuclear dos flavonóides e dos subgrupos em que se encontram divididos.

A biossíntese dos flavonóides inicia-se com a condensação do 4-coumaroil-CoA, um derivado da via do xiquimato, com três unidades de malonil-CoA, resultante da via do acetato. Após a condensação destas unidades, forma-se o composto **A** (Figura 1.9) que sofre uma reação de ciclização, catalisada pela chalcona sintetase (CHS), originando as chalconas, cuja estrutura apresenta dois anéis benzênicos separados por três carbonos. Uma segunda reação de ciclização, catalisada pela chalcona isomerase (CHI), origina as flavanonas. Os restantes subgrupos são formados a partir das flavanonas por intervenção de várias enzimas (Figura 1.9) (^bDewick, 2009; Weston e Mathesius, 2013; Winkel-Shirley, 2002).

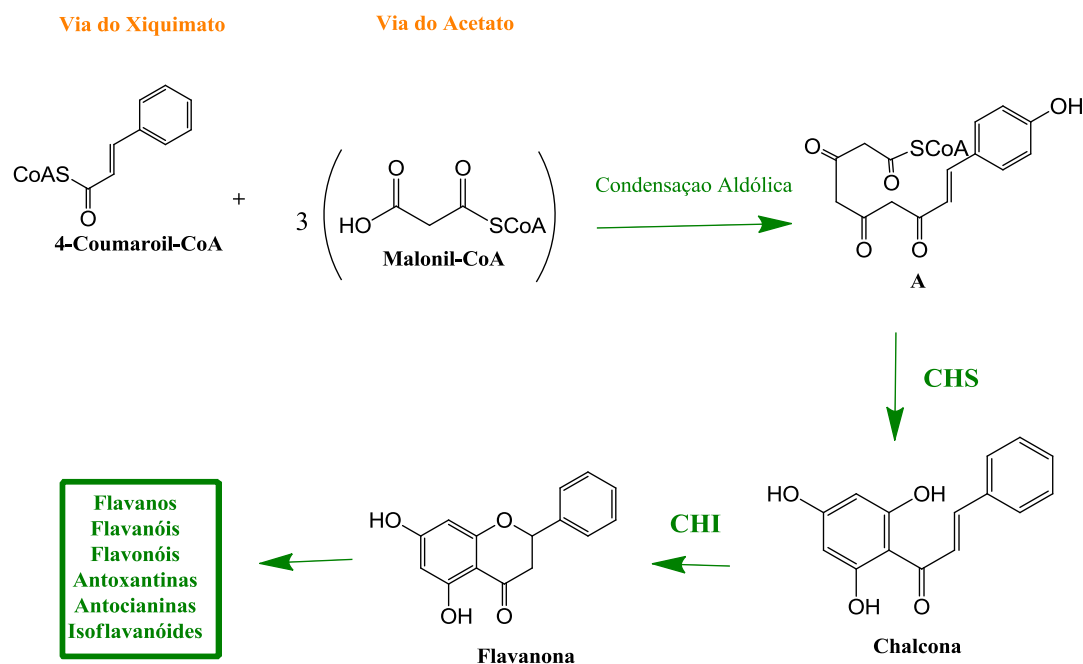
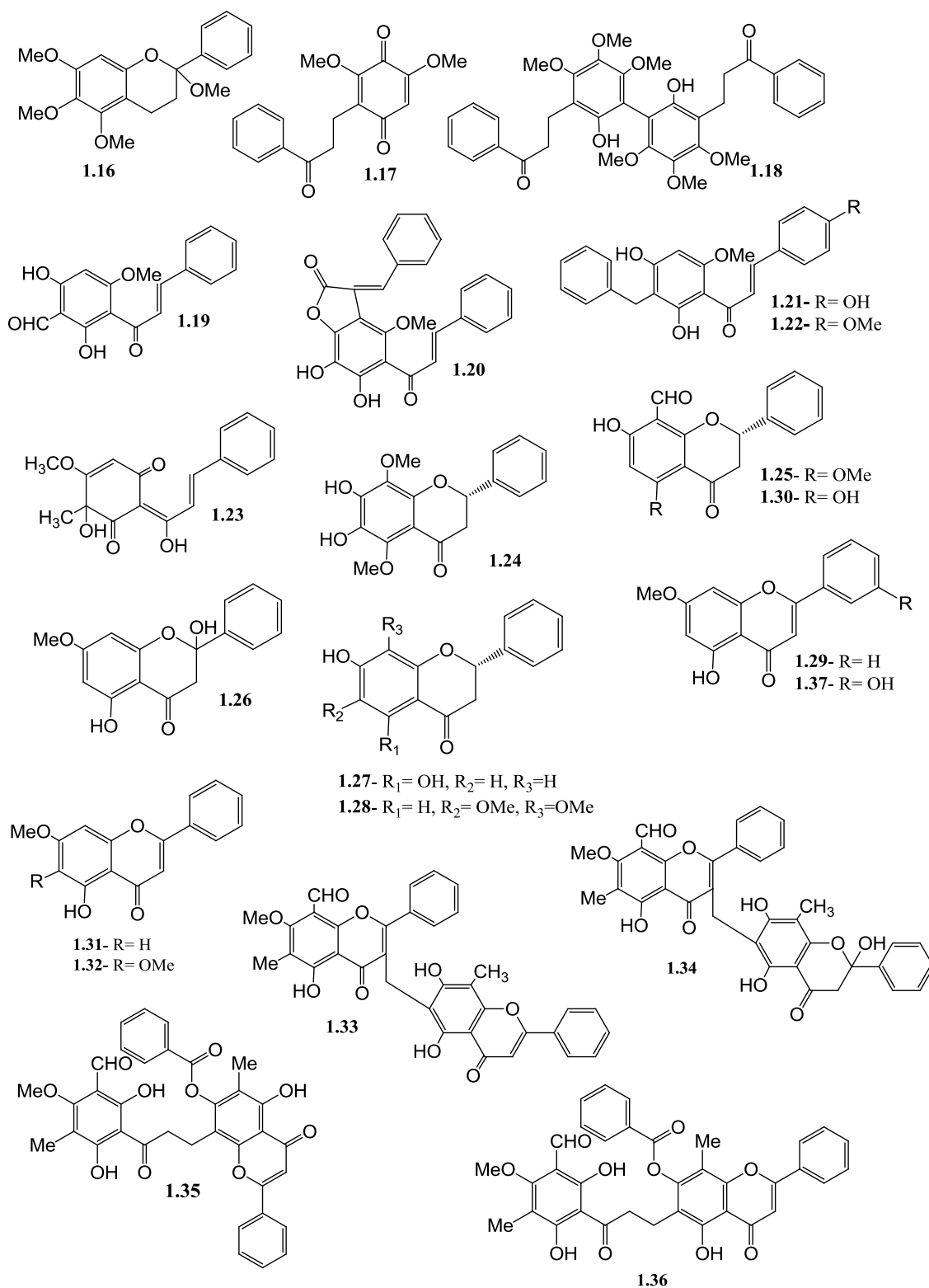


Figura 1.9: Via biossintética da formação das flavanonas (CHS, chalcona síntase, CHI chalcona isomerase).

Conforme se pode observar da análise da Tabela 1.3, os flavanóides foram a classe de metabolitos secundários que mais contribuíram para os compostos isolados da tribo *Uvarieae*. Analisando a referida tabela 1.3, em termos de atividade biológica, podemos concluir que as moléculas com esqueleto das chalconas e as flavanonas foram as que apresentaram propriedades biológicas mais relevantes, nomeadamente em termos de atividade anticancerígena.

Tabela 1.3: Flavonóides isolados de espécies da tribo *Uvarieae* nos últimos anos.

Subgrupo	Composto	Espécie	Atividade	Referências
Flavanos	1.16	<i>Fissistigma latifolium</i>	Anti- inflamatória e antioxidante	(Lan <i>et al.</i> , 2012)
	1.17	<i>Fissistigma latifolium</i>	Citotoxicidade seletiva contra células MDA-MB-231	(Lan, <i>et al.</i> , 2011)
	1.18		-	
Chalconas	1.19	<i>Friesodielsia discolor</i>	Citotoxicidade contra linhas celulares tumorais KB e MCF-7	(Prawat, <i>et al.</i> , 2012)
	1.20	<i>Fissistigma bracteolatum</i>	Antioxidante e inibição da liberação da elastase	(Wu, <i>et al.</i> , 2013)
	1.21	<i>Melodorum siamensis.</i>	Citotoxicidade contra linhas celulares tumorais humanas KB	(Prawat, <i>et al.</i> , 2013)
	1.22		-	
		<i>Uvaria scheffleri</i>	-	(Ichimaru e Nakatani, 2010)
	1.23			
	1.24	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Antioxidante	(Hwang, <i>et al.</i> , 2009)
	1.25	<i>Friesodielsia discolor</i>	Atividade anti- plasmodial contra <i>P. falciparum</i>	(Prawat, <i>et al.</i> , 2012)
	1.26	<i>Uvaria rufa</i>	-	(Andi, <i>et al.</i> , 2013)
	1.27		-	
Flavanona	1.28	<i>Dasymaschalon dasymaschalum.</i>	Citotóxica contra linhas celulares tumorais de pulmão (NCI-H187)	(Prawat, <i>et al.</i> , 2013)
	1.29	<i>Friesodielsia discolor</i>	Atividade anti- plasmodial contra <i>P. falciparum</i>	(Prawat, <i>et al.</i> , 2012)
	1.30	<i>Friesodielsia discolor</i>	-	(Prawat, <i>et al.</i> , 2012)
	1.31		-	(Andi, <i>et al.</i> , 2013)
	1.32	<i>Uvaria rufa</i>	-	
			-	
	1.33		-	(Rittiwong, <i>et al.</i> , 2011)
Flavonas		<i>Desmos chinensis</i>		
	1.34		-	
	1.35		-	
	1.36		-	
	1.37	<i>Friesodielsia discolor</i>	Citotoxicidade contra linhas celulares tumorais KB e MCF-7	(Prawat <i>et al.</i> , 2012)



1.3.3 Derivados do ciclo-hexeno

Os derivados do ciclo-hexeno, uma classe de compostos que tem como esqueleto base um hidroximetil-ciclo-hexeno, encontram-se divididos em dois grupos: os ciclo-hexenos polioxigenados e os epóxidos de ciclo-hexeno. Os ciclo-hexenos

polioxigenados têm uma insaturação no anel, quatro centros quirais e pelo menos um grupo contendo oxigênio ligado a um desses centros quirais. Os epóxidos de ciclo-hexeno podem ainda dividir-se em: monoepóxidos, que diferem dos ciclo-hexenos polioxigenados pela presença de um epóxido, e os bisepóxidos, que contêm um epóxido adicional no lugar da dupla ligação (Figura 1.10) (Zhou, *et al.*, 2010).

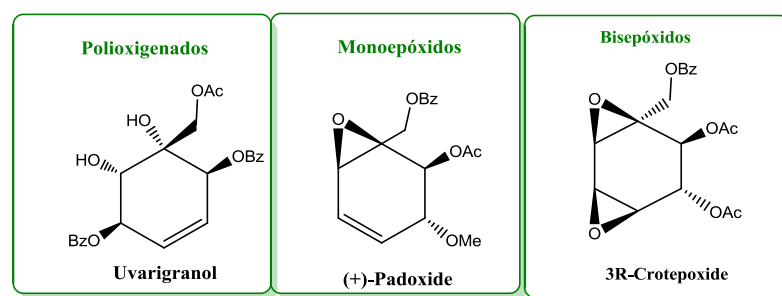


Figura 1.10: Estruturas representativas dos ciclo-hexenos polioxigenados (uvarigranol), monoepóxidos do ciclo-hexeno ((+)- padoxide) e dos bisepóxidos do ciclo-hexeno (3R-crotopoxide).

Tanto os ciclo-hexenos polioxigenados como os epóxidos estão amplamente distribuídos pela família *Annonaceae*. Os ciclo-hexenos polioxigenados, uma pequena classe de compostos descobertos no final da década de 60, que tem sido associada ao género *Uvaria*, com sucessivas descobertas de novos compostos neste género (Nkunya, 2005) (Tabela 1.4).

A biossíntese dos derivados de ciclo-hexeno começa com uma ciclização intramolecular no ácido isocorísmico, resultante de uma isomerização via reação SN_2 do ácido corísmico (Dewick, 2009), originando o óxido de areno. De seguida, o grupo carboxilo sofre uma redução enzimática, seguida de acilação, para formar o éster **B** (Figura 1.11), o percussor inicial para a formação dos epóxidos do ciclo-hexeno. De seguida ocorre abertura do 2,3-epóxido, por ataque direto do nucleófilo, originando o trans- diol. A partir desta molécula, pode ocorrer epoxidação e originar os derivados de monoepóxidos. Os monoepóxidos podem sofrer epoxidação, originar os bisepóxidos e estes os derivados polioxigenados através da abertura e acilação do epóxido (Nkunya, 2005).

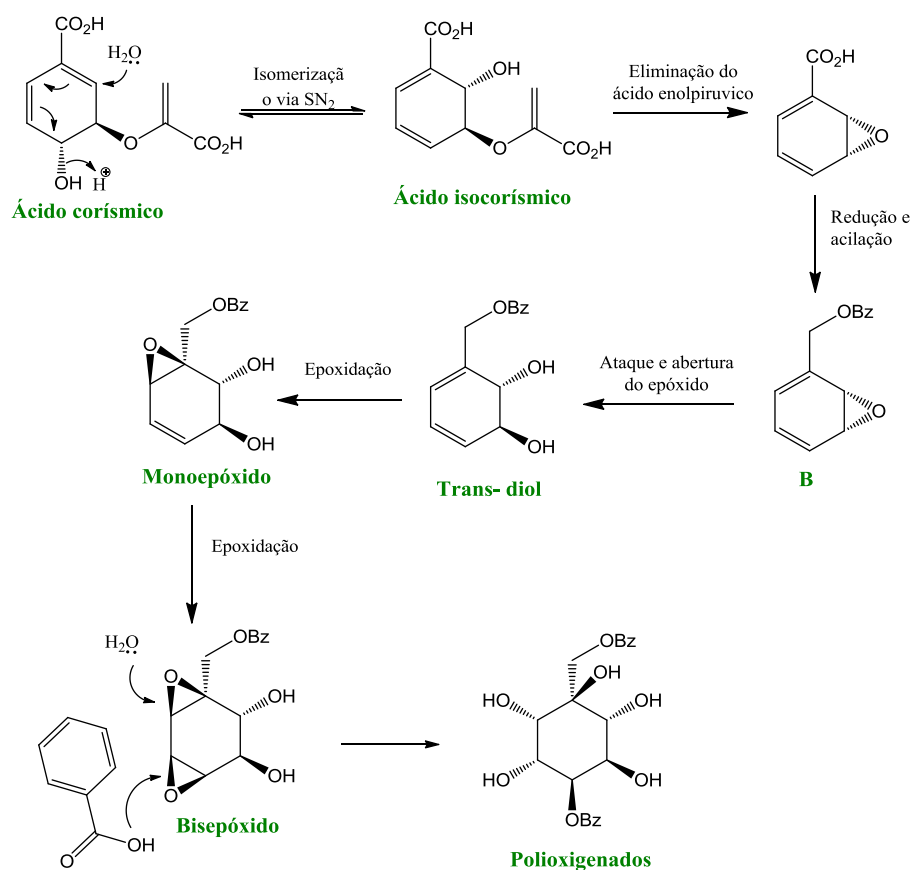
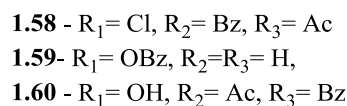


Figura 1.11: Via biossintética de formação dos ciclo-hexenos.

Nos últimos anos, isolaram-se bastantes compostos com estruturas derivados do ciclo-hexeno das espécies da tribo Uvarieae (Tabela 1.4). Destas estruturas, predomina os ciclo-hexenos polioxigenados, existindo apenas dois compostos epoxidados, mais especificamente monoepóxidos do ciclo-hexeno. Os compostos **1.56** e **1.57** revelaram ter atividade antitumoral e o composto **1.51** inibe a proliferação de linhas celulares tumorais pulmonares. É de referir que a atividade biológica desta classe de metabolitos ainda está pouco explorada.

Tabela 1.4: Novos ciclo-hexenos isolados de espécies da tribo *Uvarieae* nos últimos anos.

Composto	Espécie	Referências
1.38		
1.39		
1.40		
1.41	<i>Monanthotaxis</i>	(Starks <i>et al.</i> , 2012)
1.42	<i>congoensis</i>	
1.43		
1.44		
1.45		
1.46		
1.47	<i>Uvaria calamistrata</i>	(Zhou, <i>et al.</i> , 2011)
1.48		
1.49	<i>Uvaria boniana</i> ;	(Chen, <i>et al.</i> , 2013)
1.50		
1.51	<i>Uvaria rufa</i>	(Patrick, <i>et al.</i> , 2010)
1.52		
1.53	<i>Cleistochlamys kirkii</i>	(Stephen <i>et al.</i> , 2007)
1.54		
1.55	<i>Uvaria dulcis</i>	(Kaweetripob, <i>et al.</i> , 2015)
1.56		
1.57		
1.58		
1.59	<i>Uvaria calamistrata</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)
1.60		



Os derivados de heptano caracterizam-se por serem formados a partir de uma unidade de sete carbonos; são compostos lineares, polioxigenados e normalmente, apresentam-se com um éster cíclico α,β -insaturado terminal (Nkunya, 2005).

18

de ciclizarem para formar o ácido xiquímico, devem sofrer algumas reações de acoplamento para formar uma heptose (Figura 1.12), que é convertida num derivado do heptano (Nkunya, 2005).

Via do Xiquimato

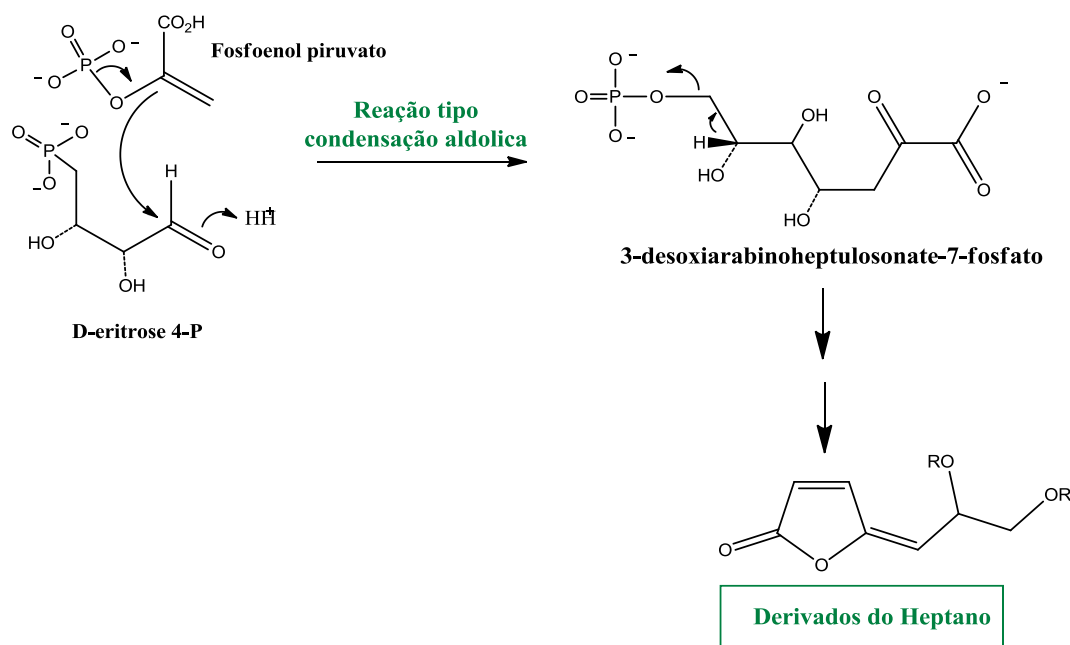
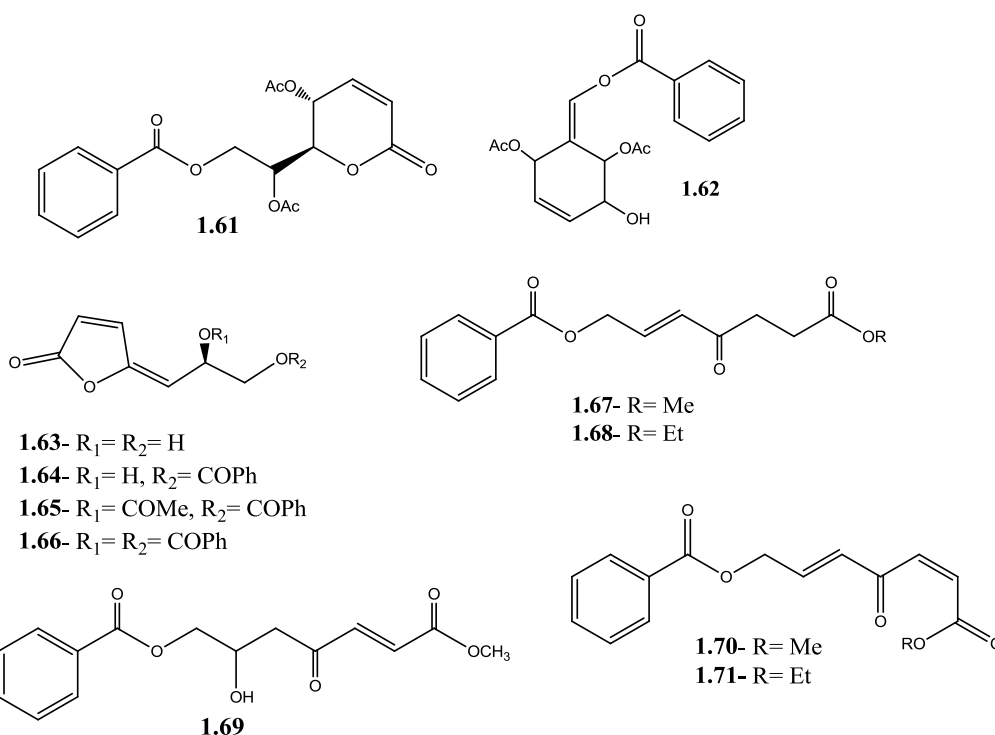


Figura 1.12: Via biossintética de formação dos derivados de heptano.

Desta classe de metabolitos foram isolados, apenas nove compostos que se apresentam na Tabela 1.5, tendo a maioria sido isolados de *Cleistochlamys kirkii*. No entanto e tal como acontece com os derivados do ciclo-hexeno, a atividade biológica destes compostos ainda está pouco explorada, sendo que até agora revelaram ter atividade antibacteriana e antifúngica (Nyandoro, 2014).

Tabela 1.5: Compostos derivados do heptano isolados nos últimos anos.

Nº	Composto	Espécie	Atividade	Referências
1.61	Cleistenolide			(Stephen, <i>et al.</i> , 2007)
1.62	Cleistodienol	<i>Cleistochlamys</i>	Atividade antibacteriana e	
1.63	(+)- shaerodiol	<i>Kirkii</i>	atividade antifúngica	
1.64	(+)- melodorinol			
1.65	(+)-acetilmelodorinol			
1.66	(+)- benzoilmelodorinol	<i>Cleistochlamys</i>	Antibacteriana e antifúngica	(Nyandoro, 2014)
1.67	Melodienona		-	
1.68	Homomelodienona		-	
1.69	7-hidroxi-6-hidromelodienona		-	(Jung, <i>et al.</i> , 1991)
1.70	Isomelodienona	<i>Melodorum</i>	-	
1.71	Homoisomelodienona	<i>fruticosum</i>	-	



1.3.5. Triterpenos

Os triterpenos são compostos constituídos por trinta átomos de carbono que se incluem na classe dos terpenos. Encontram-se divididos por dois grandes grupos, com mais de 20.000 estruturas diferentes e classificados de acordo com o número de anéis: os tetracíclicos e os pentacíclicos.

Apesar de não ser a classe de metabolitos secundários mais predominantes nas *Annonaceae*, os triterpenos isolados nesta família demonstraram igualmente um enorme interesse, tanto pelas suas estruturas, como também pela sua atividade (Hill e Connolly, 2012).

A biossíntese dos triterpenos é das mais estudadas, sendo que as suas unidades precursoras provêm da via do mevalonato e via do deoxilulose-5 fosfato (DXP). As unidades de C5 precursoras são o pirofosfato de isopentenilo (IPP) e o difosfato de dimetilalquilo (DMAPP) (Figura 1.13). A classificação dos terpenos faz-se de acordo com o número de unidades associadas, sendo os triterpenos resultantes da condensação de duas vezes três unidades isoprénicas que originam um precursor comum – o esqualeno. Esta estrutura com 30 átomos de carbono cicliza, (via síntese do 2,3-epóxido de esqualeno), e dependendo da conformação adotada durante o processo de ciclização no centro ativo do enzima, e dos rearranjos subsequentes dos grupos metilo angulares, origina os vários esqueletos triterpénicos tetracíclicos (Thimmappa, *et al.*, 2014; Augustin, *et al.*, 2011).

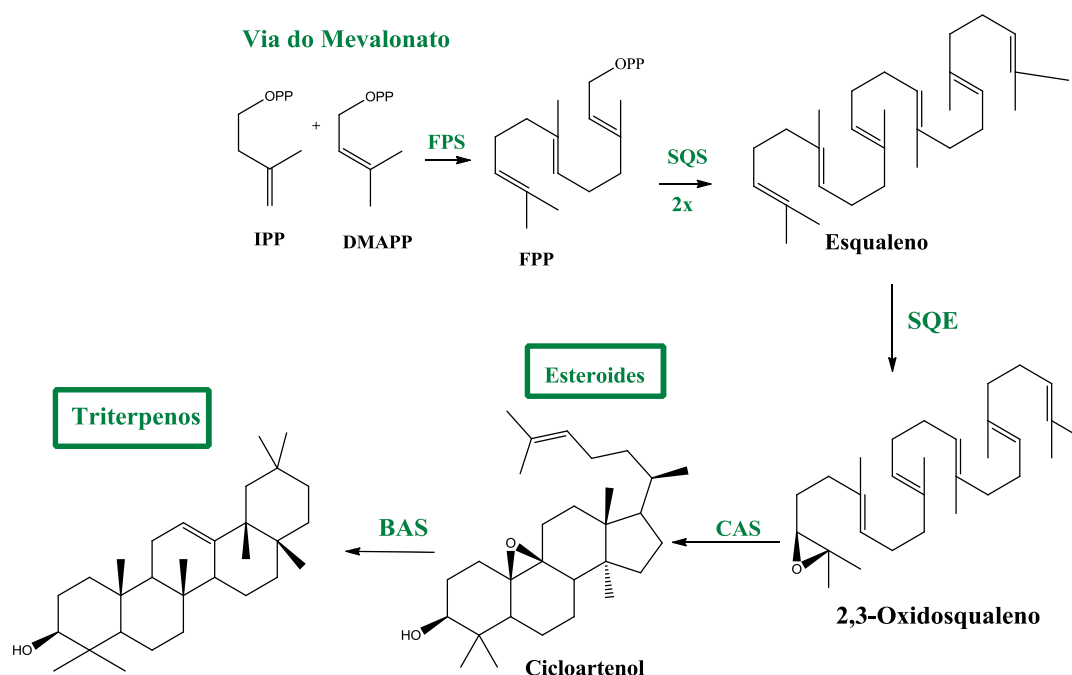
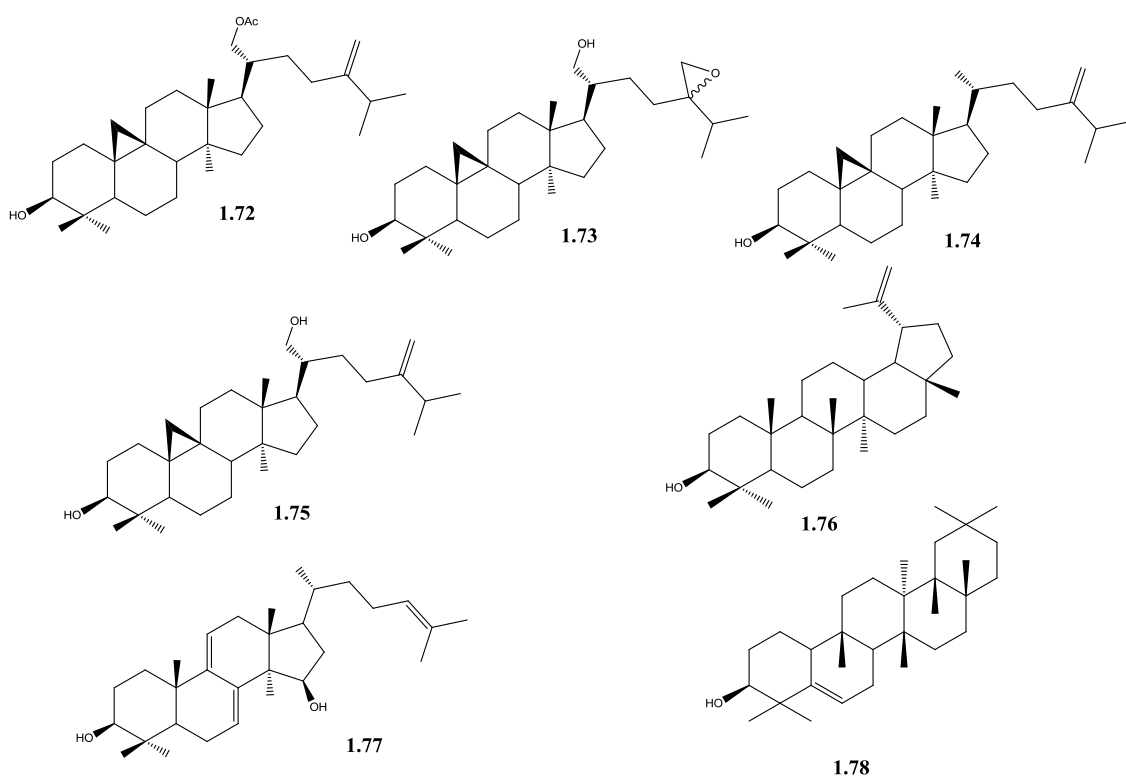


Figura 1.13: Biossíntese dos triterpenos através da via do mevalonato (IPP- difosfato de isopentil, DMAPP- difosfato dimetilalil, FPS-pirofosfato farnesil sintase, FPP- pirofosfato farnesil, SQS- esqualeno síntase, SQE-esqualeno monooxigenase, CAS- cicloartenol síntase, BAS- β - amirina síntase).

Desta classe de metabolitos, foram isolados, nos últimos anos, apenas sete compostos que se encontram na Tabela 1.6. No entanto, a atividade biológica destes compostos ainda está pouco estudada apresentando maioritariamente, atividade citotóxica.

Tabela 1.6: Triterpenos isolados na tribo *uvarieae* nos últimos anos.

Nº	Composto	Espécie	Atividade	Referências
1.72	3 β -hidroxi-21- <i>O</i> -acetil-24-metilenocicloartano		Citotoxicidade em células NCI H187	
1.73	3 β ,21-dihidroxi-24,31-epoxi-24-metilenocicloartano	<i>Dasymaschalon dasymaschalum</i> .	-	(Prawat, <i>et al.</i> , 2013)
1.74	3 β -hidroxi-24-metilenocicloartano		-	
1.75	3 β ,21-di-hidroxi-24-metilenocicloartano		-	
1.76	Lupeol	<i>Uvaria dulcis</i>	-	(Kaweetripob, <i>et al.</i> , 2015)
1.77	Policarpol	<i>Cleistochlamys kirkii</i>	-	(Stephen, <i>et al.</i> , 2007)
1.78	Glutinol	<i>Uvaria rufa</i>	-	(Andi, <i>et al.</i> , 2013)



1.3.6 Acetogeninas

Desde a descoberta do primeiro composto em 1982, as acetogeninas (ACGs) abundantemente distribuídas na família das *Annonaceae*, revelaram ser um grupo de compostos de elevado interesse, sendo conhecidos atualmente mais de 400 compostos. Este grupo de compostos é constituído por uma longa cadeia alifática com 32-34 carbonos que apresenta uma γ -lactona terminal (Zafra-Polo, *et al.*, 1998).

A cadeia carbonada longa está normalmente poli-hidroxilada. Frequentemente, a ciclização desta cadeia leva à formação de anéis de tetra-hidrofurano (THF) e tetra-hidropirano (THP). Este grupo de compostos apresenta uma variabilidade química bastante grande, sendo dividido em seis grandes grupos: as ACGs lineares, como o reticulatamol; as epóxi-ACGs (Tripoxirolina); as ACGs contendo um anel de THF (solamina), as ACGs contendo dois anéis de THF (glabracina-A), as ACGs com três anéis de THF (goniocina) e as ACGs contendo um anel de THP (mucosina) (Figura 1.16) (Bermejo, *et al.*, 2005).

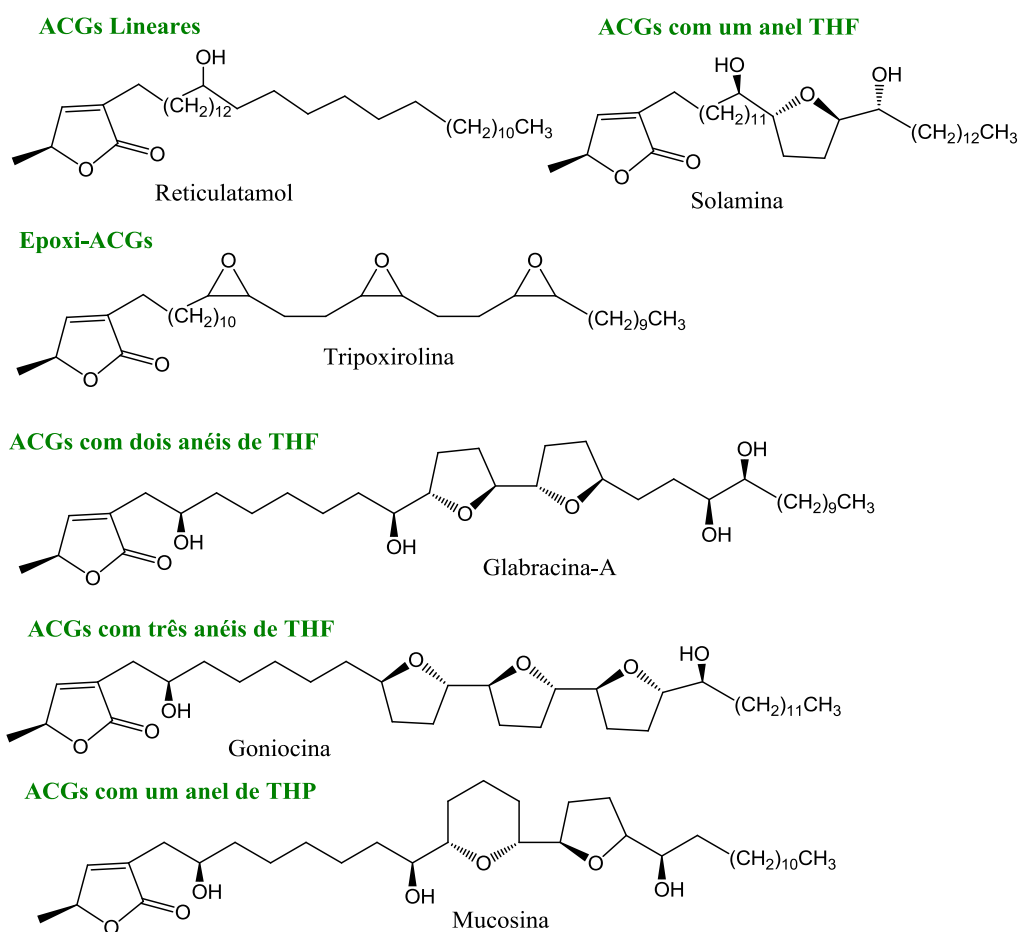


Figura 1.14: Estruturas exemplificativas de cada uma das classes das acetogeninas.

Para além da sua diversidade química, estes compostos também exibem um largo espectro de atividades biológicas nomeadamente citotóxicas, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, imunossupressora e inseticida (Bermejo, *et al.*, 2005; Motoyama, *et al.*, 2002).

Apesar de se tratar de uma classe de compostos com uma grande variedade de estruturas, apenas duas novas estruturas, os compostos **1.79 (uvaricina A)** e **1.80 (uvaricina B)**, foram isoladas nos últimos anos, nomeadamente da espécie *Uvaria sp* (Figura 1.15). Os compostos **1.79** e **1.80** foram pouco estudados em termos de atividade biológica, tendo revelado fraca atividade antiproliferativa (Dai, *et al.*, 2011).

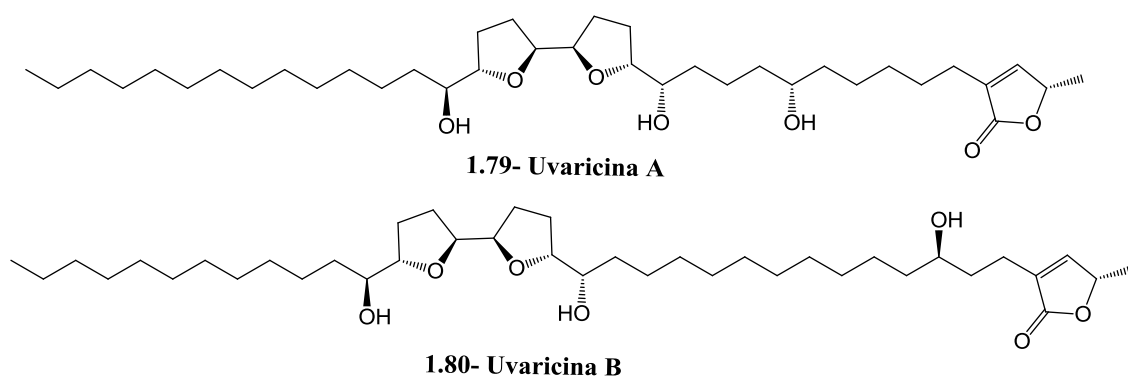


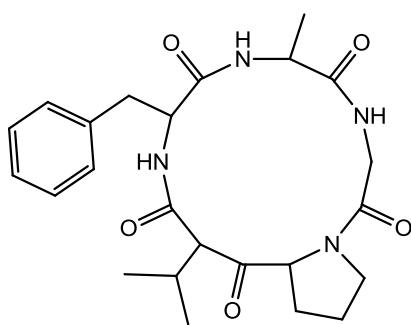
Figura 1.15: Acetogeninas identificadas nos últimos anos na tribo *Uvarieae*.

1.3.7 Outras estruturas

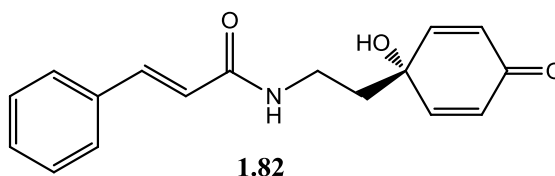
Para além dos compostos discutidos anteriormente, isolaram-se ainda outros produtos de natureza química variada que incluem, um ciclopéptido (**1.81**), uma amida (**1.82**), dois ésteres aromáticos (**1.83** e **1.84**) e um composto de natureza fenólica (**1.85**) apresentados na Tabela 1.7.

Tabela 1.7: Outras estruturas de metabolitos secundários isolados na tribo *Uvariae*.

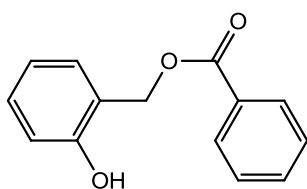
Nº	Composto	Espécie	Atividade	Referências
1.81	Desmociclo péptido	<i>Desmos rostrata</i>	-	(Bodo, <i>et al.</i> , 2009)
1.82	Melodamida A	<i>Melodorum fruticosum</i>	Inibição da regeneração do anião superóxido	(Hsiu-Hui <i>et al.</i> , 2013)
1.83	2-hidroxibenzil benzoato	<i>Dasymaschalon dasymaschalum</i> .	-	(Prawat, <i>et al.</i> , 2013)
1.84	2-fenil-2-acetoxietil benzoato		-	
1.85	Espintanol	<i>Uvaria scheffleri</i>	Citotoxicidade em células tumorais	(Ichimaru e Nakatani, 2010)



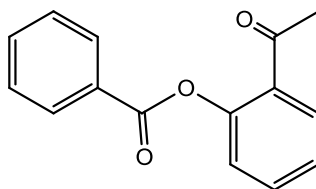
1.81



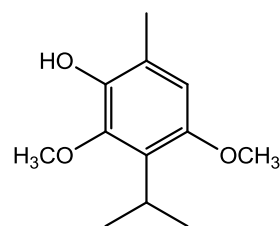
1.82



1.83



1.84



1.85

1.4. Doenças infecciosas na sociedade atual

As doenças infecciosas são causadas por bactérias, vírus, parasitas e fungos devido a uma interação complexa entre o agente patogénico, hospedeiro e o ambiente (Hemaiswarya, *et al.*, 2008). Embora a prevenção e o controlo dessas doenças tenha vindo a melhorar ao longo dos anos em grande parte do mundo, a resistência antimicrobiana representa o maior dos problemas de saúde pública global. Muitos agentes microorganismos, adquiriram ou tem vindo adquirir resistência a quase todos os fármacos antimicrobianos existentes, o que exige novas abordagens e colaborações a nível mundial com o objetivo de erradicar esses agentes patogénicos resistentes (Khabbaz,*et al.*, 2014).

A organização mundial de Saúde define resistência antimicrobiana como sendo a resistência de um microrganismo a um fármaco antimicrobiano, inicialmente efetivo no tratamento de infeções causada por esses microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas (WHO, 2015). Segundo a OMS e a FDA, as mortes por infeções respiratórias agudas, diarreia, sarampo, malária e tuberculose representam cerca de 85% da mortalidade por infeção em todo o mundo. A resistência dos microorganismos causadores dessas doenças aos fármacos de primeira linha varia de zero a quase 100%. (Mahmood, *et al.*, 2015). A principal razão associada à ineficácia dos fármacos antibacterianos é a facilidade com que as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência a um ou mais fármacos (resistência múltipla) (Wu, *et al.*, 2015). O uso indiscriminado de antibióticos é uma das principais razões que levou ao desenvolvimento de resistência múltipla por parte destes agentes patogénicos, para além da sua capacidade de adaptação (Donadio,*et al.*, 2010). É importante realçar que, para todos os antibióticos, existem estirpes sensíveis e estirpes naturalmente resistentes, cujo crescimento bacteriano é inibido (Mahmood, *et al.*, 2015).

Atualmente, o maior problema infeccioso nos hospitais são os agentes patogénicos denominados de “ESCAPE” que incluem o *Enterococcus faecium* (resistente à vancomicina), o *Staphylococcus aureus* (MRSA), o *Clostridium difficile*, o *Acinetobacter baumannii*, a *Pseudomonas aeruginosa* (resistente á fluoroquinolona) e a espécie *Enterobacteriaceae*. Estas estirpes de bactérias, Gram-positivas ou Gram-negativas, foram apelidadas de “ESCAPE”, pois têm habilidade de escapar ao efeito dos fármacos antibióticos (Peterson, 2009). Estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e de *Enterococcus* resistentes vancomicina (VRE) são os maiores

problemas da resistência bacteriana, sendo responsáveis pela maioria das infeções adquiridas tanto em ambiente hospitalar como em comunidade. Além disso, com a propagação global do MRSA, levou ao uso mais sistemático da vancomicina, um antibiótico tradicionalmente de último recurso, resultando no aparecimento de estirpes MRSA com suscetibilidade reduzida à vancomicina e com resistência intermédia ao *S. aureus* (VISA). Recentemente, têm sido relatadas estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), com elevado nível de resistência, (Gardete e Tomasz, 2014). Assim, há uma necessidade urgente no desenvolvimento de novas estratégias e fármacos antibacterianos para controlar as infeções bacterianas.

1.4.1. O *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva responsável por uma grande variedade de infeções com localização e gravidade muito distintas: infeções simples da pele e tecidos moles; toxinoses (intoxicações alimentares, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico) e infeções potencialmente fatais, como septicémias, pneumonias, osteomielites, endocardites e meningites (Sousa, 2012; Thwaites e Gant, 2011).

A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos principais microrganismos patogénicos da bactéria *Staphylococcus*, sendo os agentes mais frequentes de infeções adquiridas. A versatilidade e gravidade das infeções causadas pelo *S. aureus* devem-se principalmente a uma gama de toxinas e enzimas que produzem (Lowy, 2003; Peacock e Paterson, 2015).

As estirpes de *Staphylococcus aureus* são das mais problemáticas tanto a nível hospitalar como comunitário, devido à múltipla resistência que têm adquirido ao longo do tempo, tornando-se num dos principais agentes patogénicos a nível mundial. Na Europa, a prevalência do MRSA a nível hospitalar atinge os 24%, verificando-se diferenças significativas entre os diversos países: a prevalência é consistentemente mais baixa (< 5%) na Escandinávia e Holanda e mais elevada (> 25%) no sul da Europa e Europa leste. Portugal permanece o único país europeu com uma taxa superior a 50 % (Sousa, 2012).

A penicilina G (Figura 1.16) foi o primeiro antibiótico a que estas estirpes criaram resistência, duas décadas após o descobrimento da mesma. De seguida, no início da década de 60, foi introduzida a meticilina (Figura 1.16), em resposta à propagação da resistência à penicilina, mas rapidamente estas criaram resistência

(MRSA) (Hiramatsu *et al.*, 2014; Lowy, 2003; Peacock e Paterson, 2015). Presentemente, as estirpes de *S. aureus* constituem um dos mais problemáticos agentes patogênicos mundiais, devido ao aumento de mortalidade a que estão associadas. Além disso, o aumento da prevalência das estirpes *S. aureus* com resistência de várias intensidades à vancomicina (hVISA, VISA, VRSA), assim como à meticilina (MRSA), tornou esta bactéria num potencial agente fatal e que atualmente constitui uma das principais ameaças à saúde pública (Appelbaum, 2007).

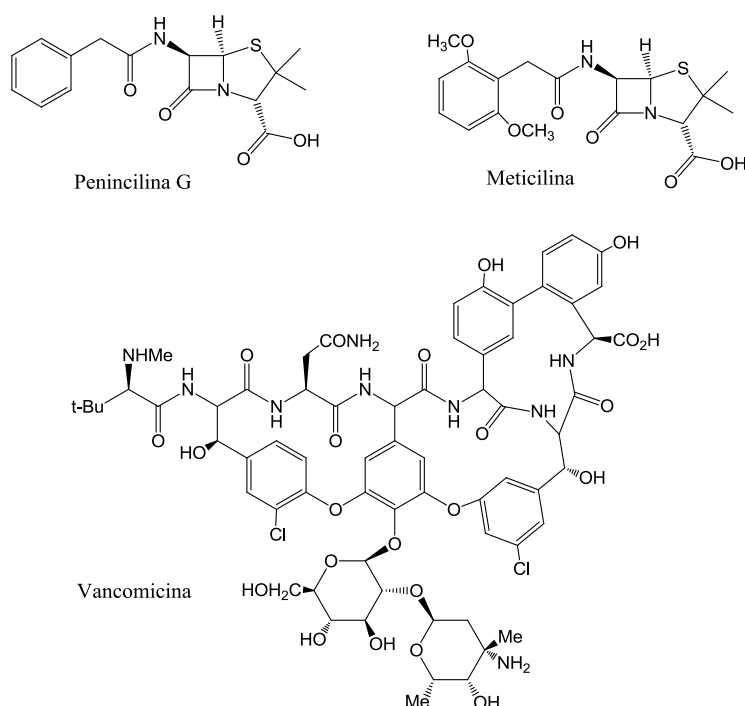


Figura 1.16: Estruturas representativas da penicilina G, meticilina e vancomicina.

Apesar do número elevado de antibacterianos existentes, há uma necessidade grande em continuar a encontrar novos agentes, uma vez que muitos dos existentes são pouco eficazes nas estirpes resistentes emergentes e o número de novos fármacos a entrar no mercado continua a diminuir (Donadio, *et al.*, 2010). Alguns dos fatores que contribuem para esta situação são as dificuldades em encontrar compostos ativos com bons perfis farmacológicos e baixa toxicidade para o ser humano. Por outro lado, observa-se um fraco desenvolvimento da indústria farmacêutica nesta área por se tratarem de tratamentos relativamente pontuais e de curta duração, muito menos rentáveis que os tratamentos crónicos (Livermore, 2011).

Deste modo, a emergência de bactérias multirresistentes cria a necessidade de procurar novos antibióticos. A metagenómica tem permitido o acesso a um reservatório

vasto e inexplorado de diversidade genética e metabólica, de bactérias terrestres e marinhas, que pode resultar na descoberta de novos e úteis produtos naturais. Assim como a modificação química e biológica de antigos antibióticos, continua a poder fornecer novos e poderosos fármacos (Clardy *et al.*, 2006).

1.4.2. Fungos

Os fungos são seres ubiqüitários que desempenham um papel importante na vida do homem, quer de uma maneira benéfica, quer de um modo prejudicial. São responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes da biosfera. São capazes de deteriorar produtos e bens de consumo do homem, como alimentos, tecidos, cabedais, metais e madeira. Encontram-se descritas cerca de 100000 espécies de fungos, sendo a maioria saprófita (Ferreira, 2010).

As infeções fúngicas em Humanos são normalmente cutâneas, variando desde das onicomicose às candidíases ou aspergiloses. Nos últimos 20 anos, a frequência dessas infeções tem vindo a aumentar drasticamente, devido a um aumento do número de doentes com maior fator de risco, tais como doentes: com idade avançada, sujeitos a parto prematuro ou a transplante de órgãos, com linfomas, com VIH, e doentes sujeitos ao tratamento de quimioterapia entre outros (Nucci e Marr, 2005; Zuzarte *et al.*, 2012).

Na década de 80, a *Candida albicans* era a maior responsável pelo aparecimento das micoses. Nos últimos anos, tornaram-se frequente o aparecimento dessas micoses em pacientes suscetíveis, sendo que mais de 50 % das infeções estão relacionadas com outras espécies de *Candida*, nomeadamente *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. (Georgopapadakou, 1998; Nucci e Marr, 2005).

Apesar da disponibilidade dos antifúngicos convencionais, o aumento da resistência destes fármacos e os efeitos secundários associados (que variam entre reações suaves a situações de hepatotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e reações hematológicas) são responsáveis pelo insucesso dos tratamentos (Zuzarte, *et al.*, 2012). Os principais grupos de antifúngicos usados na terapêutica encontram-se divididos em diferentes grupos (Figura 1.17):

- Os azoles, que constituem a maior classe de antifúngicos em uso clínico e que inibem a formação do ergosterol, um esteróide importante para a parede celular;

- As echinocandinas, que são metabolitos secundários de fungos com um hexapeptído cíclico e uma cadeia lateral lipídica, e têm como alvo o complexo de proteínas responsável pela síntese de polissacarídeos na parede celular;
- Os polienos, antibióticos naturais isolados a partir de várias espécies de *Streptomyces*. O mecanismo de ação envolve a formação de um complexo com o ergosterol e destabilização da membrana celular do fungo (Khazir *et al.*, 2013; Odds, *et al.*, 2003).

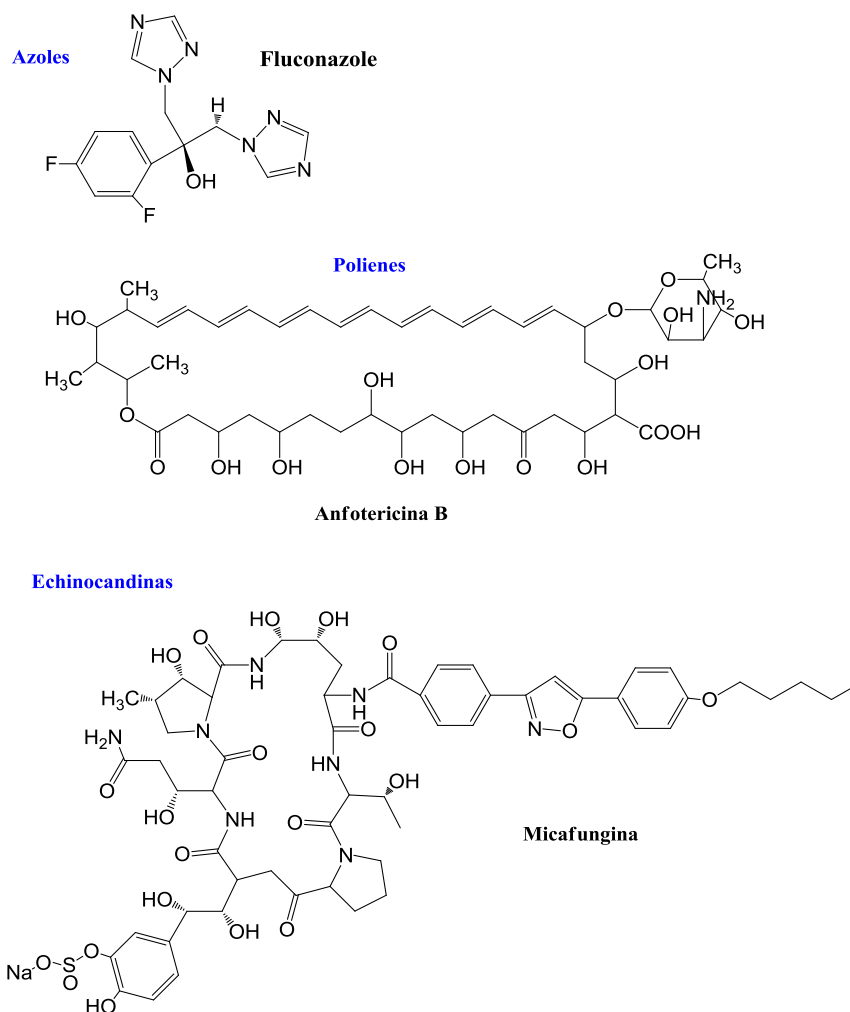


Figura 1.17: Estrutura de alguns agentes antifúngicos usados em terapêutica.

CAPÍTULO 2

Apresentação e Discussão dos Resultados

2. Apresentação e discussão dos resultados

Este trabalho surge na continuação da caracterização química e biológica da espécie *C. kirkii*, iniciada no grupo de investigação em que este trabalho se insere (Pereira, *et al.*, 2016). De acordo com o descrito, a casca da raiz moída foi extraída até à exaustão com metanol. O extrato de diclorometano, obtido por fracionamento líquido-líquido do extrato de MeOH, foi selecionado para posterior fracionamento, uma vez que foi o que apresentou maior atividade antibacteriana nas estirpes de *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA), resistente à metilicina (MRSA) e com resistência intermédia à vancomicina (VISA), apresentando uma concentração mínima inibitória (CMI) de 30, 30 e 15 µg/mL, respetivamente.

2.1. Estudo fitoquímico de *Cleistochlamys kirkii*

Do trabalho desenvolvido nesta dissertação resultou o isolamento de treze compostos: uma flavanona, a pinostrobin (2.1); três flavanonas *C*-benziladas, a dichamanetina (2.2), a isochamanetina (2.3) e a *epi*-felifrina A (2.4); um novo ciclohexeno polioxygenado, o kirkiinol (2.5); dois derivados do heptano, o (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (2.6) e o cleistonol (2.7); três triperpenos, o policarpol (2.8), o cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (2.9), o 24-metilenocicloartanol (2.10) e a β -sitostenona (2.11); o physcian (2.12) e a butirolactama (2.13) (Figura 2.1). A sua caracterização estrutural baseou-se na análise dos dados espectroscópicos de IV e RMN uni e bidimensionais. Os resultados obtidos e a respetiva discussão apresentam-se de seguida.

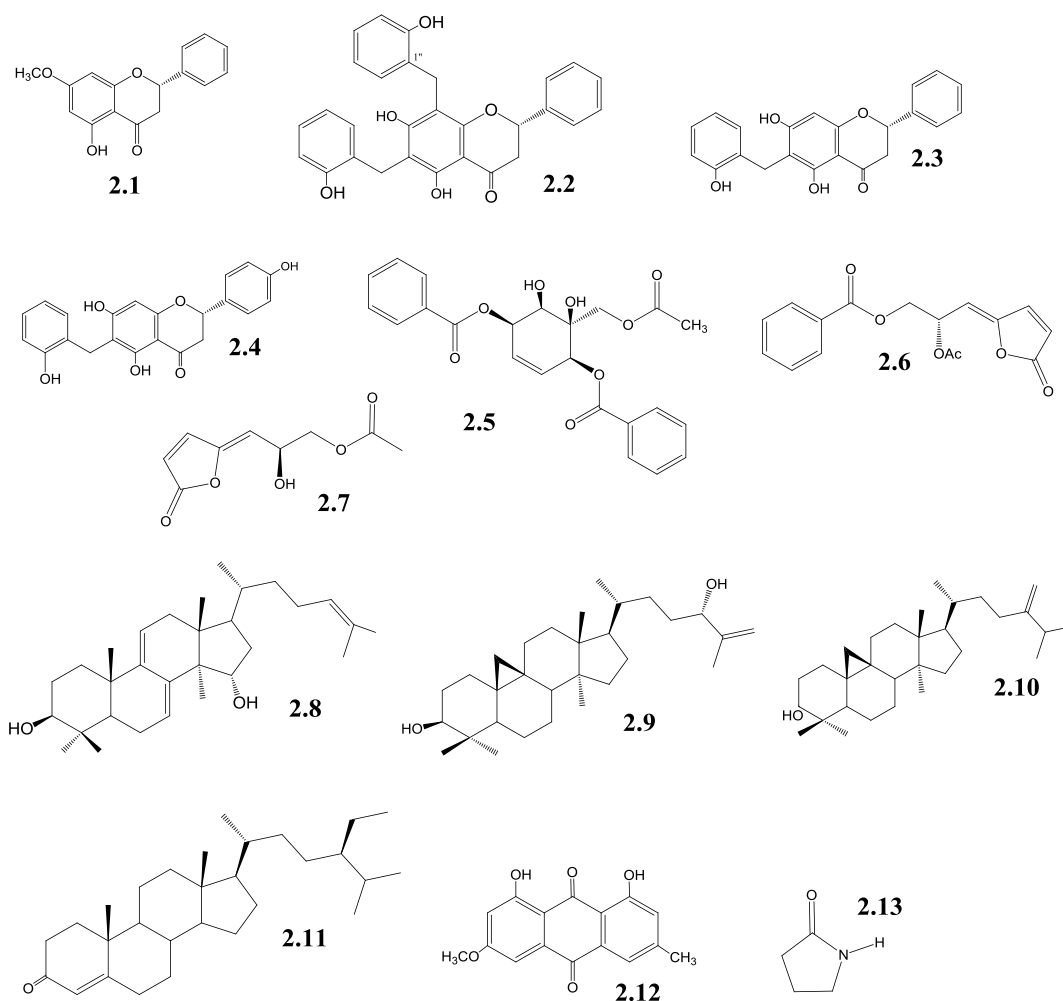
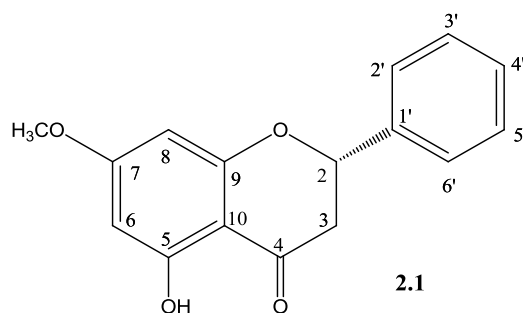


Figura 2.1: Estrutura dos compostos isolados de *Cleistochlamys kirkii*.

2.1.1. Flavanonas

2.1.1.1 Pinostrobina (2.1)

O composto **2.1** foi isolado a partir da fração **B**, tendo sido identificado como sendo a pinostrobina (Abdelwahab *et al.*, 2011; Yap *et al.*, 2007).



A fórmula molecular do composto **2.1**, $C_{16}H_{14}O_4$, foi deduzida a partir da análise do espectro de ^{13}C -RMN. O seu índice de deficiência de hidrogénios calculado é de dez, concordante com a presença de sete ligações duplas e três anéis.

No espectro de infravermelho (IV) observam-se as bandas de absorção correspondentes à vibração O-H do grupo hidroxilo a 3431 cm^{-1} . A 1653 cm^{-1} , visualiza-se a banda de absorção da ligação C=O em C₄. O grupo carbonilo aparece a esse valor devido ao facto deste estar em equilíbrio com a sua forma enólica, conforme se evidencia na figura 2.2, faz com que a sua frequência de absorção seja inferior ao espectável para cetonas α,β -insaturadas ($1685\text{-}1666\text{ cm}^{-1}$) (Pavia *et al.*, 2001).

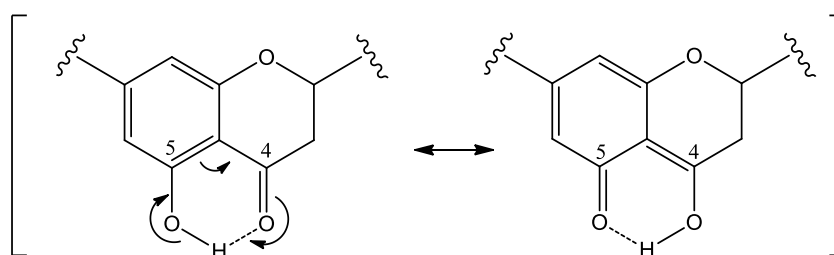


Figura 2.2: Estrutura de ressonância da ligação de hidrogénio estabelecida entre o oxigénio do grupo carbonilo na posição 4 e o hidrogénio do grupo hidroxilo da posição 5.

O esqueleto flavonóide do tipo flavanona foi indiciado pela observação no espectro de 1H RMN dos sinais atribuídos ao H₂ [δ_H 5,43 ppm (*dd*, $J = 13,0, 2,8\text{ Hz}$) e dos prótons diastereotópicos H_{3a} e H_{3b} [δ_H 3,12 (*dd*, $J = 17,2; 13,0\text{ Hz}$) e 2,83 (*dd*, $J = 17,2; 3,0\text{ Hz}$)] característicos do anel C das flavanonas (Tabela 2.1) (Yap, *et al.*, 2007).

A observação de um singuleto a campo mais baixo, δ_H 12,05 ppm, integrando para um hidrogénio sem qualquer correlação no espectro de HMQC é concordante com a presença de um grupo hidroxilo em C₅. Este próton encontra-se particularmente desblindado, devido à formação da ponte de hidrogénio com o carbonilo em C₄. Esta ligação de hidrogénio estabiliza o próton do grupo hidroxilo permitindo a sua observação no espectro de 1H -RMN (Figura 2.2).

O espectro de ^{13}C -RMN indicou a presença de 15 carbonos com ambiente químico diferente, um carbono carbonílico (δ_C 195,9 ppm), cinco carbonos ligados a oxigénio (168,1 (C₇); 164,2 (C₉); 162,9 (C₅); 79,3 (C₂) e 55,8 (C₇-OCH₃) ppm), um carbono quaternário (δ_C 138,4 ppm), um grupo metileno (δ_C 43,5 ppm) e seis grupos metino (δ_C 129,0; 128,0; 126,2; 95,2; 94,4 e 79,3 ppm) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.1**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	5,43 (<i>dd</i> , $J=13,0$; 2,8 Hz)	79,3	CH	3a, 3b	2', 3
3a	2,83 (<i>dd</i> , $J=17,2$; 3,0 Hz)	43,5	CH_2	2	2
3b	3,12 (<i>dd</i> , $J=17,2$; 13,0 Hz)				
4	-	195,9	C	-	3a, 3b
5	-	162,9	C	-	6
6	6,08 (<i>s largo</i>)	95,2	CH	-	5-OH, 8
7	-	168,1	C	-	6, 8, 7-OCH ₃
8	6,07 (<i>s largo</i>)	94,4	CH		6
9	-	164,2	C		8
10	-	103,2	C	-	5-OH, 3a
1'	-	138,4	C	-	3a, 3b
2'	7,45 (<i>m</i>) *	126,2	CH	3'	2
3'	7,45 (<i>m</i>) *	129,0	CH	2', 4'	4', 5'
4'	7,45 (<i>m</i>) *	128,0	CH	3', 5'	2', 3'
5'	7,45 (<i>m</i>) *	129,0	CH	4', 6'	3', 4', 6'
6'	7,45 (<i>m</i>) *	126,2	CH	5'	2', 5',
5-OH	12,05 (<i>s</i>)	-	-	-	-
7-OCH₃	3,84 (<i>s</i>)	55,8	CH_3	-	7

*Sinais sobrepostos

A análise do espectro de HMBC permitiu relacionar os anéis A, B e C pela observação das correlações entre os sinais de C_{10} (δ_{C} 103,2 ppm) e H_{3a} , $\text{C}_{1'}$ (δ_{C} 138,4 ppm) e H_{3b} , C_2 (79,3 ppm) e $\text{H}_{2'}$ de C_7 (168,1) e 7-OCH₃, conforme se evidencia na Figura 2.3.

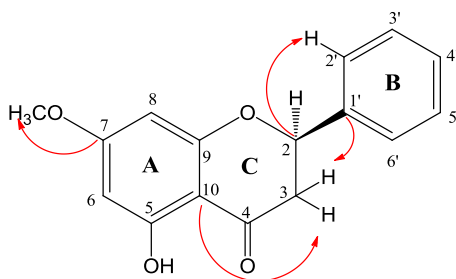


Figura 2.3: Correlações visíveis no espectro de HMBC que permitem relacionarem o anel C com os anéis A e B.

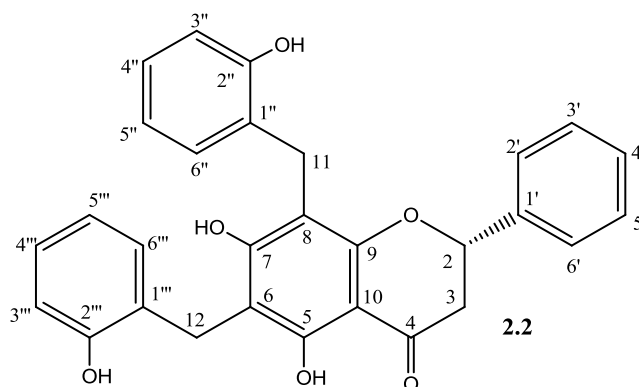
Ainda a campo baixo, na zona dos prótons aromáticos, para além de outros sinais observou-se a presença de um multiplete a δ_H 7,45 ppm ($H_{2'}$ a $H_{6'}$) que integra cinco prótons correlacionando-se entre si no espectro de COSY, o que sugere a presença de um anel benzénico mono-substituído, o anel B, confirmado pela análise dos espectros de HMQC e HMBC.

Os dados obtidos são compatíveis com os descritos na literatura para a pinostroquina **2.1** (Abdelwahab, *et al.*, 2011).

2.1.2 Flavanonas C-benziladas

2.1.2.1. Dichamanetina

O composto **2.2**, isolado a partir da fração **M₄**, foi identificado como sendo a dichamanetina, (Urgaonkar *et al.*, 2005). Esta flavanona apresenta-se C-benzilada nas posições 6 e 8 do anel A. Estes grupos benzilo encontram-se hidroxilados em *orto*.



A fórmula molecular do composto **2.2**, $C_{29}H_{24}O_6$, foi deduzida da análise do espectro de ^{13}C -RMN. O seu IDH é de dezoito, compatível com a presença de cinco anéis, quatro dos quais aromáticos.

No espectro infravermelho (IV), observam-se as bandas correspondentes à vibração O-H dos grupos hidroxilo a 3235 cm^{-1} . A 1632 cm^{-1} visualiza-se a banda de absorção da ligação C=O do C₄.

Tabela 2.2: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), MeOD, (ppm), (J em Hz)] do composto **2.2**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	5,54 (<i>dd</i> , $J = 13,0; 2,4$ Hz)	79,6	CH	3a, 3b	2', 3, 6'
3a	2,54 (<i>dd</i> , $J = 17,1; 2,9$ Hz)	43,8	CH ₂	2	1', 2
3b	3,17 (<i>dd</i> , $J = 17,0; 13,0$ Hz)				
4	-	196,0	C	-	3a, 3b
5	-	160,3	C	-	12
6	-	109,5	C	-	12
7	-	167,0	C	-	11, 12
8	-	108,8	C	-	11
9	-	159,2	C	-	11
10	-	103,3	C	-	-
11	3,98 (<i>s</i>)	24,1	CH ₂	-	6''
12	4,01 (<i>s</i>)	23,4	CH ₂	-	6'''
1'	-	140,1	C	-	3'e 6'
2'	7,64 (<i>d</i> , $J = 7,4$ Hz) *	126,7	CH	3'	2'e 6'
3'	7,59 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz) *	129,2	CH	4'	2'e 6'
4'	7,52 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz) *	129,1	CH	3', 5'	2', 3', 5'e 6'
5'	7,59 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz) *	129,2	CH	4', 6'	2', 6'
6'	7,64 (<i>d</i> , $J = 7,4$ Hz) *	126,7	CH	5'	5', 6'
1''	-	128,1	C	-	3'', 5'', 6'', 11
2''	-	154,7	C	-	3'', 4''e 6'
3''	6,90 (<i>m</i>)	115,9	CH	4''	4''e 5''
4''	7,14 (<i>t</i> , $J = 6,4$ Hz) *	127,6	CH	3'', 5''	5''e 6''
5''	6,81 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz)	120,3	CH	4'', 6''	3''
6''	7,27 (<i>d</i> , $J = 7,4$ Hz)	131,4	CH	5''	4''e 11
1'''	-	128,1	C	-	3''', 5''', 6'''
2'''	-	154,7	C	-	3''', 4''', 6'''
3'''	6,90 (<i>m</i>)	120,5	CH	4'''	5'''
4'''	7,14 (<i>t</i> , $J = 6,4$ Hz) *	127,6	CH	3''', 4'''	6'''
5'''	6,90 (<i>m</i>)	116,0	CH	4''', 6'''	3'''
6'''	7,52 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz) *	131,5	CH	5'''	12

* Sinais sobrepostos.

No espectro de ^1H RMN foram identificados os sinais característicos do esqueleto de uma flavanona (c.f Tabela 2.2), nomeadamente o metino H₂ [δ_{H} 5,54 ppm (*dd*, $J = 13,0; 2,4$ Hz)] e o metileno H₃ [δ_{H} 2,54 (*dd*, $J = 17,1; 2,9$ Hz) e 3,17 ppm (*dd*, $J = 17,0; 13,0$ Hz)] característicos do anel C. Estes sinais apresentam um padrão de

desdobramento típico de um sistema de acoplamento ABX, com o H₂ a exibir constantes de acoplamento vicinais J_{2-3b} de 13,0 Hz e J_{2-3a} de 2,4 Hz, e os prótons H₃ a exibirem para além deste, um acoplamento geminal J_{3a-3b} de 17,1 Hz. Para além dos prótons aromáticos do anel B [δ_H 7,64 (2H, *d*, J = 7,4 Hz), 7,59 (*t*, J = 7,4 Hz) 7,52 (*t*, J = 7,4 Hz)], observaram-se, ainda, sinais a δ_H 7,27 (*d*, J = 7,4 Hz), 7,14 (*t*, J = 6,4 Hz), 6,90 (*m*), 6,81 (*t*, J = 7,4 Hz) ppm, atribuíveis a oito grupos metino aromaticos dos grupos benzilo.

Os espectros de ^{13}C -RMN e DEPT apresentaram dados compatíveis com os deduzidos do espectro de ^1H -RMN, evidenciando vinte e sete sinais. Para além do grupo carbonilo a δ_C 196,0 ppm, característico de uma cetona conjugada em C₄, observaram-se, ainda, treze metinos (dos quais um oximetino a 79,6 ppm) e doze carbonos quaternários aromáticos compatíveis com a presença de quatro anéis aromáticos na estrutura. Foi, igualmente, possível observar a presença de três grupos metileno atribuídos a C₃ (δ_C 43,8 ppm) e aos dois carbonos benzílicos [δ_C 23,4 (C₁₂) e 24,1 ppm (C₁₁)] (cf tabela 2.2).

A análise dos espectros bidimensionais permitiu determinar sem ambiguidade a estrutura da molécula. Através das experiências de COSY e HMQC foram estabelecidos fragmentos dos prótons acoplados (Figura 2.4), entre os quais os fragmentos aromáticos. As correlações J_{H-H} dos prótons aromáticos dos grupos benzilo permitiram determinar o padrão de substituição dos anéis correspondentes, como sendo hidroxilados em *orto*. Observaram se, ainda, correlações típicas das flavanonas, entre os prótons H₂/H_{3 α,β} .

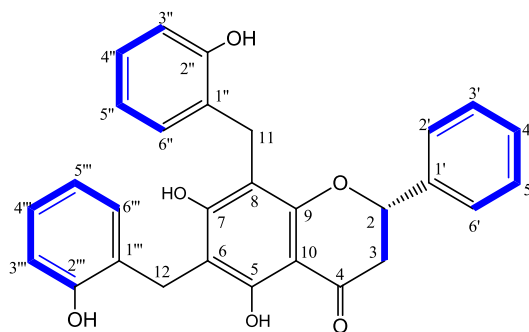


Figura 2.4: Fragmentos estruturais estabelecidos através da experiência de ^1H - ^1H COSY do composto 2.2.

Para além dos sinais referidos, foi possível observar no espectro de ^1H -RMN dois singletos a δ_H 3,98 (H₁₁) e 4,01 ppm (H₁₂), correspondentes a dois grupos metileno que, pelas correlações observadas no espectro de HMBC, entre o H₁₂ e C₅ (δ_C

160,3 ppm), C₆ (δ_C 109,5 ppm) e C₇ (δ_C 167,0 ppm), e entre o próton H₁₁ e C₇, C₈ (δ_C 108,8 ppm) e C₉ (δ_C 159,2 ppm), se verificou estarem ligados ao anel A da flavanona (Figura 2.5).

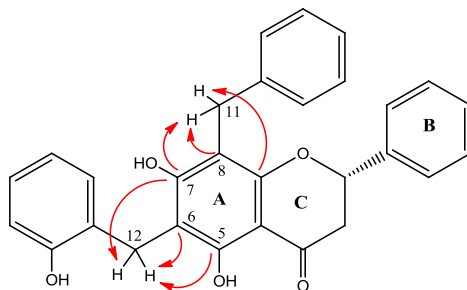


Figura 2.5: Correlações no espectro de HMBC que permitem verificarem a ligação dos grupos metilenos, H₁₁ e H₁₂, em relação ao anel A do composto **2.2**.

Os grupos metilenos H₁₁ e H₁₂ correlacionam-se, no espectro de HMBC, com os respectivos carbonos nas posições *orto* (C_{2''}/H₁₁, C_{6''}/H₁₁, C_{2'''}/H₁₂ e C_{6'''}/H₁₁), assim como o carbono (C_{2''}/H_{3''}, C_{2'''}/H_{3'''}; C_{6''}/H₁₁, C_{6'''}/H₁₂ e C_{1''}/H₁₁) (Figura 2.6).

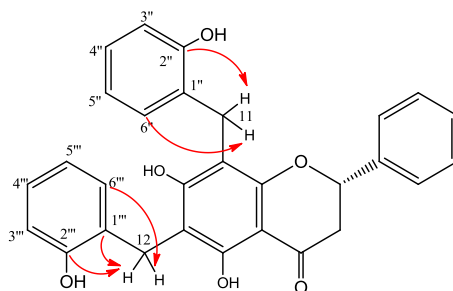
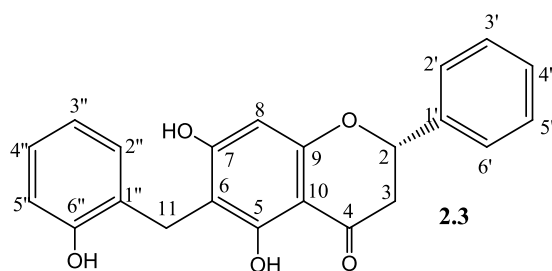


Figura 2.6: Correlações observadas no espectro de HMBC que permitiu definir a posição do hidroxilo no anel aromático dos grupos benzilado composto **2.2**.

Este composto já havia sido isolado a partir desta planta (Pereira, *et al.*, 2016). Os dados apresentados estão concordantes com os descritos na literatura (Achenbach, *et al.*, 1997).

2.1.1.2.2. Isochamanetina

O composto **2.3** foi isolado a partir da fração **O**, tendo sido identificado a isochamanetina, uma flavanona C-benzilada com um grupo benzílico no anel A (Achenbach *et al.*, 1997).



A fórmula molecular do composto **2.3**, $C_{22}H_{18}O_5$, foi deduzida da análise do espectro do ^{13}C -RMN. O seu índice de deficiência de hidrogénios é de catorze, concordante com a presença de quatro anéis, três dos quais aromáticos e uma ligação $C=O$.

No espectro infravermelho (IV), observam-se as bandas de absorção correspondentes aos grupos hidroxilo a 3432 cm^{-1} . A banda observada a 1653 cm^{-1} é concordante com a presença de uma ligação $C=O$. Adicionalmente, a 1292 e a 798 cm^{-1} , encontram-se as bandas de absorção das ligações $C-O$ e a banda de absorção da ligação $C-H$ característica dos anéis aromáticos di-substituídos em *orto* (Achenbach *et al.*, 1997).

No espectro de 1H -RMN (Tabela 2.3), foram visíveis os sinais característicos do esqueleto das flavanonas: os prótons diastereotópicos do grupo metileno H_3 [δ_H 3,07 (1H, *dd*, $J = 17,1; 12,9$ Hz), 2,73 (1H, *dd*, $J = 17,1; 3,1$, Hz)] e do metino H_2 a δ_H 5,41 (*dd*, $J = 12,9; 3,0$ Hz). A observação de um grupo oximetino a δ_C 80,4 ppm e de dois grupos metileno a δ_C 44,3 e 22,4 ppm confirmaram os dados obtidos no espectro de 1H -RMN, (δ_H 5,41; 2,73/3,07 e 3,80 ppm, respetivamente).

No espectro de ^{13}C -RMN observaram-se 20 sinais de carbono, incluindo um carbono carbonílico [δ_C 197,5 ppm (C_4)] , cinco carbonos ligados a oxigénio [δ_C 80,4 (C_2), 155,5 (C_6''), 162,7 (C_9), 162,5 (C_7) e 165,9 ppm (C_5)], dez carbonos correspondentes a grupos metino de anéis aromáticos [δ_C 95,9 (C_8), 115,8 (C_4''), 120,7 (C_3''), 127,3 (C_2' e C_6'), 127,8 (C_5''), 129,6 (C_4'), 129,7 ppm (C_3' , C_5'), 130,6 (C_2''),] e dois carbonos quaternários [δ_C 128,0 (C_1''), 131,1 (C_1') ppm] (Tabela 2.3).

A campo mais baixo, na zona dos prótons aromáticos, para além de outros sinais observou-se a presença de três sinais entre 7,47-7,34 ppm (H_2' - H_6') correspondentes a cinco prótons correlacionados entre si no espectro de COSY, o que sugeriu a presença de um anel benzénico (anel B) monossustituído, confirmado pela análise dos espectros de HMQC e HMBC.

Tabela 2.3: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.3**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	5,41(<i>dd</i> , $J = 12,9$; $3,0$ Hz)	80,4	CH	3a, 3b	2', 3
3a	2,73 (<i>dd</i> , $J = 17,1$; $3,1$ Hz)	44,3	CH_2	2, 3b	2
3b	3,07 (<i>dd</i> , $J = 17,1$; $12,9$ Hz)			2, 3a	2
4	-	197,5	C	-	3
5	-	165,9	C	-	11
6	-	108,6	C	-	8, 11
7	-	162,5	C	-	8, 11
8	6,00 (<i>s</i>)	95,9	CH	-	-
9	-	162,7	-	-	8
10	-	103,4	C	-	8
11	3,80 (<i>s</i>)	22,4	CH_2	-	2''
1'	-	131,1	C	-	3a, 3b
2'	7,46 (<i>dd</i> , $J = 8,0$; $1,4$ Hz)	127,3	CH	3'	3', 6'
3'	7,39 (<i>m</i>)	129,7	CH	2'	5', 6'
4'	7,34 (<i>m</i>)	129,6	CH	3', 5'	2', 3'
5'	7,39 (<i>m</i>)	129,7	CH	6'	2', 3'
6'	7,46 (<i>dd</i> , $J = 8,0$; $1,4$ Hz)	127,3	CH	5'	2', 3'
1''	-	128,0	C	-	2'', 3'', 5'', 11
2''	6,98 (1H, <i>m</i>)	130,6	CH	3''	4', 11
3''	6,66 (<i>td</i> , $J = 7,4$; $1,2$ Hz)	120,7	CH	2'', 3''	5'
4''	6,73 (<i>dd</i> , $J = 8,0$; $1,1$ Hz)	115,8	CH	3'', 5''	2''
5''	6,93 (<i>dd</i> , $J = 7,5$; $1,7$ Hz)	127,8	CH	4''	3''
6''	-	155,5	C	-	2'', 4'', 11

Foi ainda possível observar no espectro de ^1H RMN um singuleto a δ_{H} 3,80 (H_{11}), correspondente ao grupo metileno que através das correlações observadas no espectro de HMBC, entre o H_{11} e C_5 (δ_{C} 165,9 ppm), C_6 (δ_{C} 108,6 ppm) e C_7 (δ_{C} 162,5 ppm) se verificou estar ligado ao anel A da flavanona (Figura 2.7).

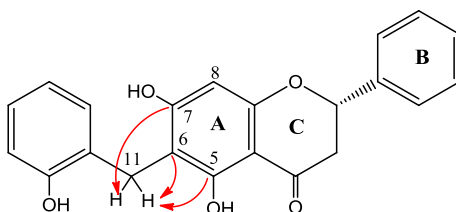


Figura 2.7: Correlações no espectro de HMBC que permitiram verificar a ligação do grupo metileno H_{11} ao anel A do composto **2.3**.

Através das correlações observadas no espectro de COSY entre os prótons do anel aromático do grupo benzílico [δ_H 6,66 – 6,98 ppm ($H_{2''}$ - $H_{6''}$) foi possível estabelecer dois fragmentos estruturais que permitiram concluir que o anel aromático se encontrava hidroxilado em *orto* (Figura 2.8). As correlações observadas entre o H_{11} do grupo metileno e o $C_{2''}$ e $C_{6''}$ permitiram posicionar este grupo na estrutura.

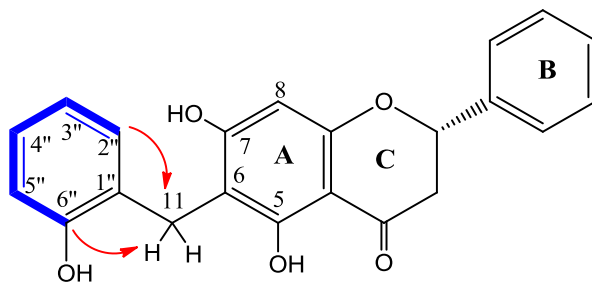
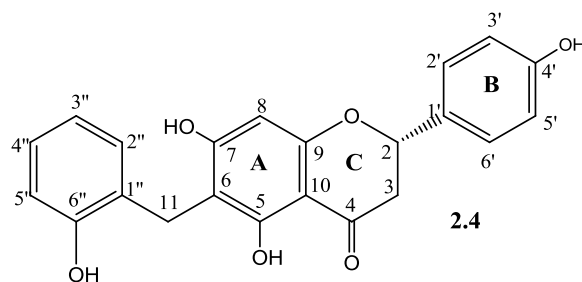


Figura 2.8: Fragmentos estruturais estabelecidos através da experiência 1H - 1H COSY e correlações observadas no espectro de HMBC, que permitiram definir a posição do hidroxilo no anel aromático do grupo benzilo do composto **2.3**.

Este composto já havia sido isolado a partir desta planta (Pereira, *et al.*, 2016). Os dados apresentados estão concordantes com os descritos na literatura (Achenbach *et al.*, 1997).

2.1.1.2.3. *Epi-feligrina A*

O composto **2.4**, isolado a partir da fração M_{5A} , foi identificado como sendo a *epi-feligrina A*, uma flavanona C-benzilada que difere do composto anterior por apresentar o anel B *p*-hidroxilado (Wu, *et al.*, 2011).



A fórmula molecular do composto **2.4**, $C_{22}H_{18}O_6$, foi deduzida da análise do espectro do ^{13}C RMN. O seu índice de deficiência de hidrogénios é de catorze, concordante com a presença de quatro anéis, dos quais dois aromáticos e uma ligação $C=O$.

O espectro de infravermelho (IV), do composto **2.4** apresentou as seguintes bandas significativas: 3432 cm^{-1} correspondente à vibração O-H dos grupos hidroxilo, 1633 cm^{-1} característico da ligação C=O em C₄.

No espectro de ^1H e ^{13}C -RMN (cf. Tabela 2.4) foram visíveis os sinais característicos do esqueleto das flavanonas nomeadamente o metileno H₃ [δ_{H} 3,09 (1H, *dd*, $J = 17,2; 13,2\text{ Hz}$), 2,65 (1H, *dd*, $J = 17,2; 2,7\text{ Hz}$)] e o oximetino H₂ a δ_{H} 5,30 (*dd*, $J = 13,2; 2,7\text{ Hz}$), que correspondem aos sinais δ_{C} 44,1 e a 80,5 ppm, respetivamente.

Tabela 2.4: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC, e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), MeOD, (ppm), (J em Hz)] do composto 2.3.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	5,30 (<i>dd</i> , $J = 13,2; 2,7\text{ Hz}$)	80,5	CH	3a, 3b	2', 3
3a	2,65 (<i>dd</i> , $J = 17,2; 2,7\text{ Hz}$)	44,1	CH ₂	2	2
3b	3,09 (<i>dd</i> , $J = 17,2; 13,2\text{ Hz}$)				
4	-	198,0	C	-	3
5	-	166,1	C	-	11
6	-	108,5	C	-	8, 11
7	-	163,9	C	-	8, 11
8	5,95 (<i>s</i>)	95,8	CH	-	-
9	-	166,1	-	-	8
10	-	103,3	CH	-	8
11	3,77 (<i>s</i>)	22,4	CH ₂	-	2''
1'	-	131,1	C	-	3a, 3b
2'	7,28 (<i>d</i> , $J = 8,4\text{ Hz}$) *	129,0	CH	3'	3', 6'
3'	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,5\text{ Hz}$) *	116,2	CH	2'	5', 6'
4'	-	159,0	C	-	2', 3'
5'	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,5\text{ Hz}$) *	116,2	CH	6'	2', 3'
6'	7,28 (<i>d</i> , $J = 8,4\text{ Hz}$) *	129,0	CH	5'	2', 3'
1''	-	128,1	C	-	2'', 3'', 5'', 11
2''	6,94 (<i>d</i> , $J = 7,5\text{ Hz}$) *	130,6	CH	3''	4', 11
3''	6,64 (<i>t</i> , $J = 7,2\text{ Hz}$) *	120,7	CH	2'', 3''	5'
4''	6,71 (<i>t</i> , $J = 7,8\text{ Hz}$)	115,8	CH	3'', 5''	2''
5''	6,94 (<i>d</i> , $J = 7,5\text{ Hz}$) *	127,8	CH	4''	3''
6''	-	155,4	C	-	2'', 4'', 11

*Sinais sobrepostos.

A campo mais baixo, na zona dos prótons aromáticos, observaram-se dois sinais a δ_{H} 7,28 (H_{2'} e H_{6'}) e 6,77 ppm (H_{3'} e H_{5'}) correspondentes a quatro prótons correlacionados entre si no espectro de COSY, o que sugeriu a presença de um anel

benzénico substituído em *para*. O sinal de um carbono a δ_C 159,0 ppm indicou a presença de um grupo OH em C_{4'}. A análise das correlações observadas no espectro de HMBC entre C_{4'} e o H_{2'/H_{6'}} e o H_{3'/H_{5'}}, (Figura 2.9) permitiram confirmar a hipótese anterior.

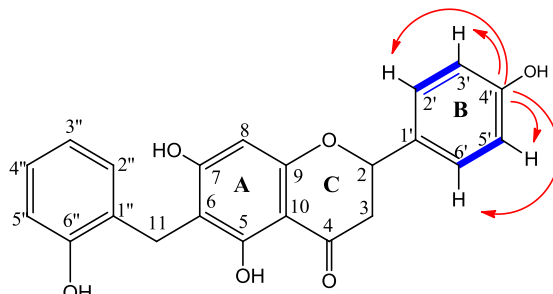


Figura 2.9: Fragmentos estruturais do composto **2.3**, estabelecidos através da experiência ^1H - ^1H COSY e correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram caracterizar a estrutura do anel B.

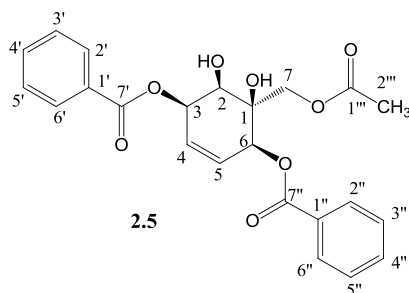
Os restantes sinais apresentaram desvios e desdobramentos semelhantes aos descritos para a isochamanetina **2.3**. Os dados obtidos foram compatíveis com os descritos na literatura para este composto (Wu *et al.*, 2011).

2.1.1.3. Derivados de ciclo-hexeno

2.1.1.3.1. Kirkiinol (2.5)

O composto **2.5** ($[\alpha]_D^{22} = -122,6$), isolado a partir da fração **M**, designado por kirkinol, é um composto novo derivado de um ciclo-hexeno, que se encontra hidroxilado em C₁, C₂ e benzoilado em C₃ e C₆.

A fórmula molecular do composto **2.5**, C₂₃H₂₂O₈, é consistente com o ião pseudomolecular a m/z 446 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ observado no espectro de massa (ESI-MS). O seu índice de deficiência de hidrogénio de 13 é compatível com a presença de um anel ciclo-hexeno, dois grupos benzoílo e um grupo acetato.



O espectro de IV exibiu uma banda a 3463 cm^{-1} , característica dos grupos hidroxilo, uma banda a 1714 cm^{-1} correspondentes a grupos éster. O valor de frequência

de vibração destes carbonilos é inferior ao dos carbonilos característicos de grupos éster alifáticos saturados ($1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$), uma vez que existe um anel aromático na posição α que faz com que o comprimento da ligação $\text{C}=\text{O}$ aumente e consequentemente, baixe a frequência (Figura 2.10) (Pavia *et al.*, 2001). Foi também observada uma banda correspondente à ligação $\text{C}-\text{O}$ da função éster a 1265 cm^{-1} .

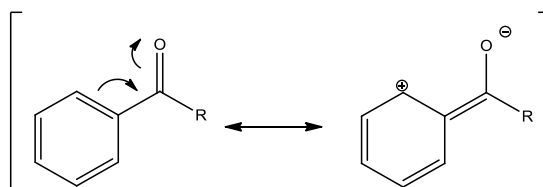


Figura 2.10: Efeito de ressonância verificado entre o anel aromático e o grupo carbonilo.

O espectro de ^1H -RMN apresentou sinais correspondentes a três oximetinos [δ_{H} 5,77 (*dd*, $J = 6,1; 2,2 \text{ Hz}$, H_3), 5,68 (1H, *d*, $J = 3,6 \text{ Hz}$, H_6) e 4,25 (*d*, $J = 6,1 \text{ Hz}$, H_2)], um oximetileno [δ_{H} 4,62 (*d*, $J = 12,2 \text{ Hz}$, H_{7b}) e 4,41 (*d*, $J = 12,2 \text{ Hz}$, H_{7a})], dois metinos olefinicos [δ_{H} 6,05 (*dd*, $J = 10,1; 3,6 \text{ Hz}$, H_5) e 5,99 (*d*, $J = 10,1; 2,2 \text{ Hz}$, H_4)] e ainda os sinais correspondentes a prótons aromáticos de dois grupos benzoílos (Tabela 2.5).

No espectro de ^{13}C -RMN observaram-se 23 sinais, incluindo os cinco carbonos oxigenados com hibridação *sp*³ [δ_{C} 66,7 (C_7), 71,1 (C_6), 73,5 (C_3), 71,7 (C_2) e 74,8 ppm (C_1)], dois carbonos olefinicos [δ_{C} 128,7 (C_4) e 126,7 ppm (C_5)], um grupo metilo [δ_{C} 20,7 ppm ($\text{C}_{2''}$)] e três ésteres [(δ_{C} 165,8 ($\text{C}_{7''}$), 167,1 ($\text{C}_{7'}$), 170,8 ($\text{C}_{1''}$) ppm)] (cf Tabela 2.2).

No espectro de COSY foi possível identificar os fragmentos principais da molécula, nomeadamente o esqueleto do ciclo-hexeno e os dois grupos benzoílo presentes na molécula (Figura 2.11).

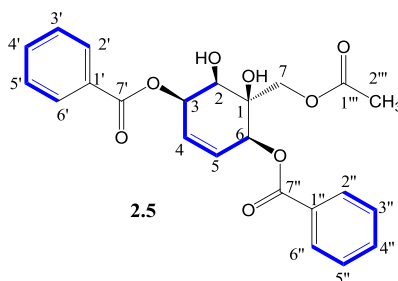


Figura 2.11: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência ^1H - ^1H -COSY do composto 2.5.

Tabela 2.5: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.5**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC	NOESY
1	-	74,8	C	-	2, 3, 6, 7a, 7b,	-
2	4,25 (<i>d</i> , $J = 6,1$ Hz, 1H)	71,7	CH	3	7a, 7b, 6, 3, 4	3
3	5,77 (<i>dd</i> , $J = 6,1$; 2,2 Hz)	73,5	CH	3, 4	2, 4, 5,	2
4	5,99 (<i>d</i> , $J = 10,1$; 2,2Hz)	128,7	CH	3, 5	2, 3, 6	-
5	6,05 (<i>dd</i> , $J = 10,1$; 3,6 Hz)	126,7	CH	4, 6	3, 6,	-
6	5,68 (<i>d</i> , $J = 3,6$ Hz)	71,1	CH	5	1, 1'', 2, 4, 5,	2
7a	4,41(<i>d</i> , $J = 12,2$ Hz,)	66,7	CH_2	7a	2, 6, 9,	-
7b	4,62 (<i>d</i> , $J = 12,2$ Hz)			7b		-
1'	-	133,6	C	-	2', 3'	-
2'	8,05 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	129,8	CH	4'	4', 5'	-
3'	7,47(<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)	128,72	CH	3', 4'	3', 5', 6'	-
4'	7,60 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz)	133,7	CH	4', 6'	3', 4', 6'	-
5'	7,47 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)	128,72	CH	3', 4'	4', 5', 7'	-
6'	8,05 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	129,8	CH	4'	5', 6'	-
7'	-	167,1	C	-	3, 3''	-
1''	-	129,5	C	-	3'', 4''	-
2''	8,05 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	130,01	CH	4''	4'', 5''	-
3''	7,47 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)	128,6	CH	3'', 4''	3'', 5'', 6 ,,	-
4''	7,60 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz)	133,7	CH	4'', 6''	3'', 4'', 6''	-
5''	7,47 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)	128,6	CH	3'', 4''	3'', 5'', 6 ,,	-
6''	8,05 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	130,0	CH	4''	4'', 5''	-
7''	-	165,8	C	-	3''	-
1'''	-	170,8	C	-	7, 10	-
2'''	1,88 (<i>s</i>)	20,7	CH_3	-	9	-
1-OH	3,58 (<i>s</i>)	-	-	-	-	2-OH
2-OH	3,37 (<i>s</i>)	-	-	-	-	1-OH

As principais heterocorrelações observadas no espectro de HMBC estão esquematizadas na figura 2.12. Destas realçam-se as heterocorrelações dos prótons H_6 e H_7 com o carbono oxigenado a δ_{C} 74,8 ppm (C_1). A localização específica dos dois grupos benzoílo foi conseguida pela observação das correlações dos prótons H_3 e H_6 com os carbonos carbonílicos a δ_{C} 167,1 ($\text{C}_{7'}$) e 165,8 ppm ($\text{C}_{7''}$), respetivamente.

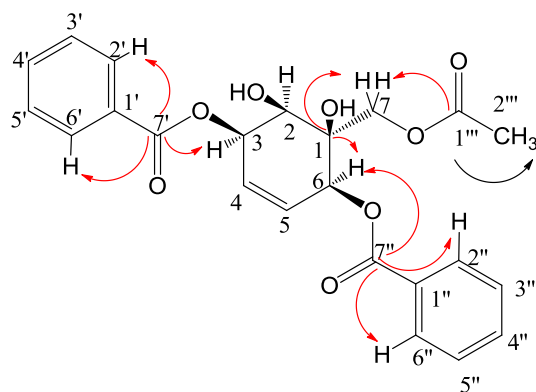


Figura 2.12: Principais correlações observadas no espectro de HMBC para o composto **2.5**.

A estereoquímica do anel de ciclo-hexeno foi estabelecida pela análise dos valores das constantes de acoplamento entre H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , H_6 e encontra-se esquematizada na figura 2.11. A comparação destes valores com os descritos na literatura permitiu estabelecer que os prótons H_2 e H_3 estão em posição di-axial ($J_{2,3} = 6,1$ Hz), os prótons H_3 e H_4 exibem um acoplamento axial-equatorial ($J_{3,4} = 2,2$ Hz), em que o próton H_4 se encontra em posição equatorial em relação ao H_3 . O próton H_5 encontra-se em posição pseudo-equatorial em relação ao H_6 ($J_{5,6} = 3,6$ Hz) por comparação com valores de constantes de acoplamento de compostos semelhantes descritos na literatura (Chen *et al.*, 2013; Jolad *et al.*, 1981; Takeuchi *et al.*, 2001).

No espectro de NOESY as correlações observadas entre H_3/H_2 e H_6/H_5 permitiram definir a estereoquímica da posição C_6 . Adicionalmente, as correlações observadas entre o próton H_{1-OH} e o próton H_{2-OH} permitiram definir estereoquímica definida para o estereocentro C_1 (Figura 2.13).

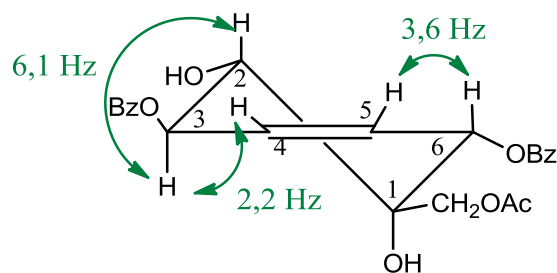
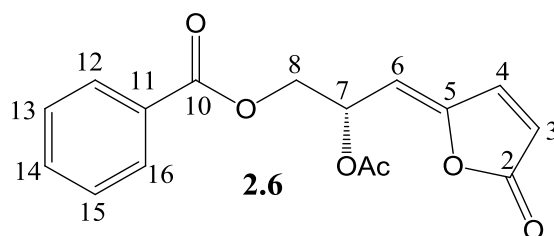


Figura 2.13: Correlações observadas no espectro de NOESY, e valores de constantes de acoplamento no espectro de 1H -RMN do composto **2.5**.

2.1.1.4. Derivados do heptano

2.1.1.4.1 (R)-(E)-Acetilmelodorinol

O composto **2.6**, isolado a partir da Fração **O**, foi identificado como sendo o (R)-(E)-acetilmelodorinol.



A fórmula molecular do composto **2.6**, $C_{16}H_{14}O_6$, foi deduzida da análise do espectro de ^{13}C -RMN. O seu índice de deficiência de hidrogénio de dez é concordante com a estrutura do composto.

No espectro de IV, observou-se uma banda de absorção a 1784 cm^{-1} , característica da vibração da ligação $C=O$ da γ -lactona α,β -insaturada (Silverstein, R.M, 1998). A existência de ésteres foi sugerida pela observação de uma banda a 1749 cm^{-1} , com uma frequência de vibração mais alta do que seria expectável, indicando a presença de um carbonilo conjugado (Silverstein, R.M, 2005) e uma banda a 1722 cm^{-1} correspondente ao $C=O$ do éster do grupo acetato. A 1225 cm^{-1} observou-se a banda de absorção característica da vibração da ligação $C-O$ da função éster.

A presença de uma γ -lactona α,β -insaturada foi indicada pela presença, no espectro de 1H -RMN, dos sinais de uma dupla ligação di-substituída a δ_H 6,34 (dd , $J = 5,6; 1,8\text{ Hz}$, H_3) e 7,90 (dd , $J = 5,6; 0,6\text{ Hz}$, H_4).

Os valores dos desvios químicos dos prótons e dos carbonos da ligação dupla $\Delta^{3,4}$, são explicados pela ressonância entre a dupla ligação e o grupo carbonilo, fazendo com que a posição β fique mais desblindada em relação à posição α , como se pode observar na Figura 2.14.

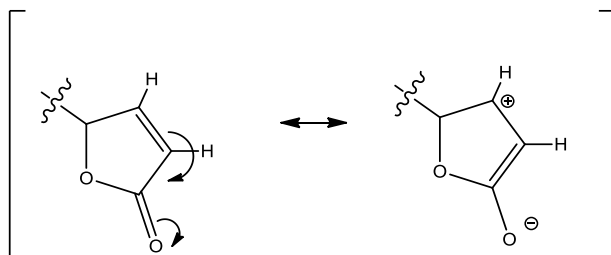


Figura 2.14: Ressonância da dupla ligação com o grupo carbonilo da lactona.

Esta γ -lactona insaturada encontra-se ligada a uma cadeia carbonada, constituída por três carbonos, evidenciada pela presença dos sinais a δ_{H} 5,72 (*m*, H_6), 5,98 (*m*, H_7) e 4,54 ppm (*dd*, $J = 11,8$; 4,3 Hz, H_{8a}) e 4,46 (1H, *dd*, $J = 11,8$; 6,6 Hz, H_{8b}).

No espectro de ^{13}C -RMN os sinais que suportam a presença da lactona foram os observados a δ_{C} 168,6 ppm (C_2) correspondente ao carbono carbonílico, a δ_{C} 122,6 (C_3) e 140,3 ppm (C_4) correspondentes aos carbonos da dupla $\Delta^{3,4}$, e a δ_{C} 153,6 ppm (C_5) correspondente ao carbono γ do sistema conjugado. Esta encontra-se ligada a uma dupla ligação $\Delta^{5,6}$ [δ_{C} 153, 6 (C_5) e 107,6 ppm (C_6)] e a uma cadeia carbonada δ_{C} 66,8 (C_7) e 65,1 ppm (C_8) (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.6**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	-	168,6	C	-	3, 4
3	6,34 (<i>dd</i> , $J = 5,6$; 1,8 Hz)	122,6	CH	4	4, 6
4	7,90 (<i>dd</i> , $J = 5,6$; 0,6 Hz)	140,3	CH	3, 6	3, 7
5	-	153,6	C	-	3, 4, 6, 7
6	5,72 (1H, <i>m</i>)	107,6	CH	4, 7	7, 8
7	5,98 (1H, <i>m</i>)	66,8	CH	6, 8	
8a	4,54 (<i>dd</i> , $J = 11,8$; 4,3 Hz)	65,1	CH_2	6	7
8b	4,46 (<i>dd</i> , $J = 11,8$; 6,6 Hz)				
10	-	166,1	C	-	8, 12
11	-	129,4	C	-	13, 15
12	8,01(<i>dd</i> , $J = 8,5$; 1,7 Hz)	129,8	CH	13	14, 16
13	7,46 (<i>m</i>)	128,6	CH	12, 14	-
14	7,58 (<i>m</i>)	133,6	CH	13,15	12,16
15	7,46 (<i>m</i>)	128,6	CH	12, 14	
16	8,01(<i>dd</i> , $J = 8,5$; 1,7 Hz)	129,8	CH	13	14, 16
7-OCOCH₃	-	170,2	C	-	2', 7
7-OCOCH₃	2,08 (<i>s</i>)	21,18	CH_3	-	-

A presença de uma estrutura do tipo γ -lactona insaturada foi confirmada pela observação do espectro de COSY onde foram identificados os fragmentos associados aos sinais a δ_H 5,72 (*m*, H₆), 5,98 (*m*, H₇) 4,54 (*dd*, *J* = 11,8; 4,3, H_{8a}) e 4,46 (*dd*, *J* = 11,8; 6,6 Hz, H_{8b}), bem como os sinais do anel aromático. (Figura 2.15).

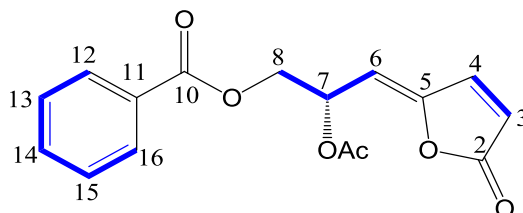


Figura 2.15: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência de COSY do composto **2.6**.

A observação das heterocorrelações no espectro de HMBC entre C₄ e H₆, C₅ e H₄, H₆, C₁₀ e H₈, H₁₁ e H₁₂ e 7-OCOCH₃ e H₇ permitiu confirmar a estrutura do composto (Figura 2.16).

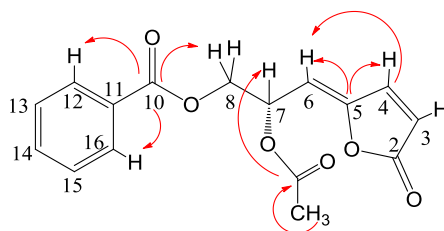
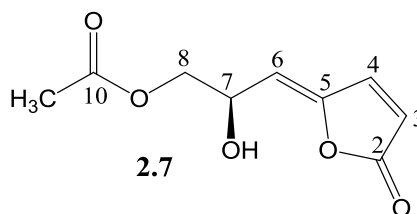


Figura 2.16: Correlações mais importantes observadas no espectro de HMBC do composto **2.6**.

Este composto já havia sido isolado a partir desta planta (Monteiro, 2014). A estrutura do composto foi estabelecida por comparação com os dados descritos na literatura (Shen, *et al.*, 1996)

2.1.1.4.3. Cleistonol (2.7)

O composto **2.7** ($[\alpha]_D^{22} = +27,6$), isolado a partir da fração N, foi identificado como sendo um novo derivado do heptano. Esta estrutura é muito semelhante ao composto **2.6**, diferindo no padrão de esterificação, encontrando-se neste caso os grupos OH em C₇ livre e em C₈ esterificados com um grupo acetato.



No espectro de massa do composto **2.7** observou-se um íon pseudomolecular a m/z 221 $[M + Na]^+$, concordante com a fórmula $C_9H_{10}O_5$, à qual corresponde um IDH é de cinco.

No espectro de IV, observou-se uma banda de absorção a 3382 cm^{-1} , correspondente ao grupo OH, uma banda a 1750 cm^{-1} , característica da vibração da ligação C=O da γ -lactona α,β -insaturada (Silverstein, R.M, 1998). A existência de um segundo grupo carbonilo foi indicada pela observação de uma banda a 1720 cm^{-1} . A 1242 cm^{-1} observou-se a banda de absorção característica da vibração da ligação C-O da função éster.

A presença de uma γ -lactona α,β -insaturada foi indicada pela presença, no espectro de ^1H -RMN, dos sinais de uma dupla ligação di-substituída a δ_H 7,69 (d , $J = 5,5\text{ Hz}$, H_4), 6,35 (d , $J = 5,5\text{ Hz}$, H_3).

No espectro de ^{13}C -RMN, a observação dos sinais a δ_C 171,0 ppm (C_2), correspondente ao carbono carbonílico, a δ_C 121,5 (C_3), e 145,8 (C_4), correspondentes aos carbonos da dupla $\Delta^{3,4}$, e a δ_C 151,5 (C_5), sustentam a presença de uma γ lactona. Os carbonos a δ_C 65,5 e 67,8 ppm evidenciaram a presença de dois carbonos oxigenados, um grupo metino (C_7) e um oximetileno (C_8) (Tabela 2.7), respectivamente.

Tabela 2.7: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.7**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
2	-	171,0	C	-	3, 4
3	6,35 (d , $J = 5,5\text{ Hz}$)	121,5	CH	4	4
4	7,69 (d , $J = 5,5\text{ Hz}$,)	145,8	CH	3	3, 6
5	-	151,5	C	-	3, 4, 6, 7
6	5,44 (d , $J = 8,5\text{ Hz}$)	114,9	CH	7	7, 8
7	4,85 (m)	65,5	CH	6, 8	6,8
8a	4,14 (m)	67,8	CH_2	6	7
8b	3,73 (m)				
10	-	172,6	C	-	8, 11
11	2,08 (m)	20,6	CH_3		-

Apesar das semelhanças estruturais dos compostos **2.6** e **2.7**, observaram-se diferenças muito significativas entre os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN. Como se pode

observar da análise da Tabela 2.8, além do desaparecimento dos sinais na zona aromática e da presença de um sinal de um grupo metilo, os metinos H₄ [δ_H 7,69 ppm (d , $J = 5,5$ Hz)], H₆ [δ_H 5,44 ppm (d , $J = 8,5$ Hz)] e H₇ [δ_H 4,85 ppm (m)] sofreram um desvio diamagnético $\Delta\delta_H$ (0,21, 0,28 e 1.13 ppm, respectivamente). Relativamente aos sinais no espectro de ^{13}C -RMN, os carbonos C₄ (δ_C 145,8ppm) e C₆ (δ_C 114,9 ppm) deslocaram-se para campo mais baixo 5,5 e 7.3 ppm, respectivamente, ao contrário dos carbonos C₅ (δ_C 151,5 ppm) e C₆ (δ_C 65,5 ppm) que ressoam a campo mais alto $\Delta\delta_C$ (2,1 e 1.3 ppm, respetivamente).

Tabela 2.8: Principais diferenças entre os compostos **2.6** e **2.7** no espectro de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN [400 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)].

Posição	^1H		^{13}C	
	2.6	2.7	2.6	2.7
4	7,90 (dd , $J = 5,6\text{Hz}$)	7,69 (d , $J = 5,5$ Hz,)	140,3	145,8
5	-	-	153,6	151,5
6	5,72 (m)	5,44 (d , $J = 8,5$ Hz)	107,6	114,9
7	5,98 (m)	4,85 (m)	66,8	65,5

A presença de uma estrutura do tipo γ -lactona insaturada, foi confirmada pela análise ao espectro de COSY, pela presença dos sinais a δ_H 5,44 (m , H₆), 4,85 (m , H₇) e 4,14 (m , H₈) (figura 2.17).

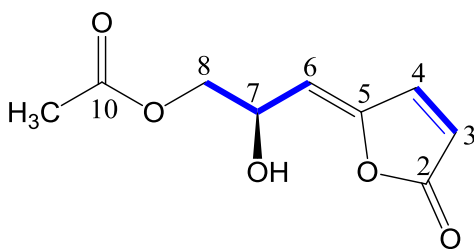


Figura 2.17: Fragmentos estruturais estabelecidos pela experiência de COSY do composto **2.7**.

A presença de um OH em C₇, sugerida pela observação no espectro de IV de uma banda característica de um grupo OH, foi confirmada pelo desvio químico de H₇. A localização do acetato em C₈ foi confirmada pela observação da alteração da posição dos prótons H₈, pelo aparecimento de um singuleto integrando três prótons a 2,08 ppm característico de grupos acetilo e pela análise das heterocorrelações presentes no

espectro de HMBC. Também se observaram heterocorrelações entre o C₄ e H₆, C₅ e H₄, H₆, H₇, C₁₀ e H₁₁ e H₈, o que permitiu confirmar a estrutura do composto (Figura 2.18)

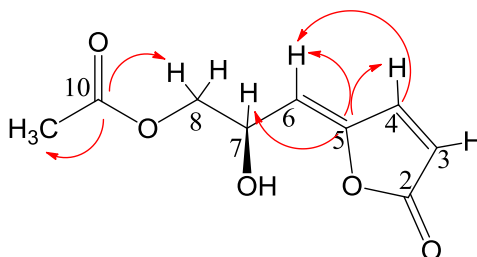
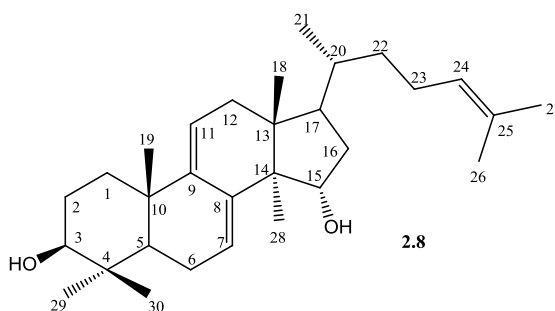


Figura 2.18: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto **2.7**.

2.1.1.4. Triterpenos

2.1.1.4.1. Policarpol

O composto **2.8**, isolado sob a forma de um sólido amorfo de cor branca, foi caracterizado como sendo um triterpeno tetracíclico, derivado do lanosterol, o policarpol (Hamonniere, *et al.*, 1976).



A fórmula molecular do composto **2.8**, C₃₀H₄₈O₂, foi deduzida da análise do espectro de ¹³C-RMN. O índice de deficiência de hidrogénio de sete é concordante com a presença de quatro anéis e três ligações duplas.

No espectro de infravermelho deste composto, foi observada uma banda de absorção a 3356 cm⁻¹ correspondente ao grupo hidroxilo.

O espectro de ¹³C-RMN 30 carbonos indicando a presença de um esqueleto triterpénico. A presença de uma cadeia lateral insaturada, característica dos triterpenos tetracíclicos, foi sugerida pela observação de um duplete a δ_H 0,85 ppm (*d*, *J* = 4,3 Hz, H₂₁) e pela existência de uma dupla ligação tri-substituída, sendo dois dos substituintes, grupos metilo geminais que ressoaram a δ_H 1,68 e 1,60 ppm.

Este composto apresenta uma forte absorção no UV o que sugeriu a existência de um sistema conjugado na estrutura, tal foi indicado pela observação no espectro de

^1H -RMN dos sinais olefínicos a δ_{H} 5,87 (*d*, $J = 6,2$ Hz, H_7) e 5,31 ppm (*d*, $J = 5,9$ Hz, H_{11}) atribuíveis às duas ligações duplas conjugadas $\Delta^{7,8}$ e $\Delta^{9,11}$. Observou-se ainda um outro próton olefínico a 5,07 ppm (*t*, $J = 7,1$ Hz) atribuído ao H_{24} (cf. Tabela 2.9).

No espectro de ^1H -RMN observaram-se, ainda, cinco singletos, a campo alto, correspondentes aos grupos metilo angulares (δ_{H} 0,61; 0,88; 0,94; 0,98 e 1,00 ppm). A existência no espectro de ^1H -RMN de um sinal δ_{H} 3,18 ppm (1H, *dd*, $J = 10,2$; 5,7 Hz) é compatível com a localização em C_3 de um grupo hidroxilo com orientação β -equatorial. A multiplicidade e constantes de acoplamento apresentadas por este sinal (*dd*) estão associadas à posição α -axial do próton em C_3 , o que é consistente com os acoplamentos axial-equatorial ($J = 5,7$ Hz) e axial-axial ($J = 10,2$ Hz) com os prótons em C_2 (Figura 2.19).

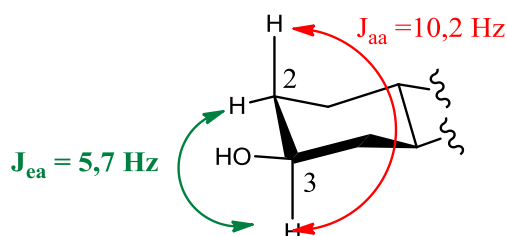


Figura 2.19: Acoplamentos observados no espectro ^1H -RMN entre H_2 e H_3 .

Os dados evidenciados no espectro de ^1H -RMN foram confirmados pela análise dos espectros de ^{13}C -RMN, no qual se identificaram trinta sinais, que incluem sete carbonos quaternários, oito metinos, sete metilenos e oito metilos, Tabela 2.8. Destes sinais destacam-se quatro carbonos com hibridação sp^2 a δ_{C} 147,6 (C_9), 142,3 (C_8), 122,4 (C_7) e 117,2 ppm (C_{11}), correspondentes ao dieno conjugado heteroanelar, característico de alguns derivados do lanostano, e cujos valores de ressonância se apresentam em conformidade com os descritos na literatura para lanostanos com uma estrutura similar (Emmons, *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1993).

Observaram-se, ainda, dois carbonos associados à insaturação da cadeia lateral $\Delta^{24,25}$ a δ_{C} 131,3 e 126,0 ppm, assim como os sinais característicos dos dois grupos metilo terminais a δ_{C} 25,8 e 17,8 ppm, atribuídos a C_{26} e C_{27} , respectivamente. De realçar, que no espectro de ^{13}C -RMN, para além do oximetino δ_{C} 79,5 em C_3 observou-se um outro a δ_{C} 74,9 ppm, atribuído ao carbono C_{15} .

Tabela 2.9: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.8**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
1	1,39 (, <i>m</i>) 2,03(, <i>m</i>)	35,8	CH_2	2	19
2	1,68 (<i>m</i>)	28,2	CH_2	1, 2	-
3	3,18 (<i>dd</i> , $J = 10,2$; 5,7 Hz)	79,5	CH	2	29, 30
4	-	38,7	C	-	-
5	1,07 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz)	49,1	CH	6	7, 19,
6	2,12 (<i>2m</i>)	23,0	CH_2	5, 7	5, 7
7	5,87 (<i>d</i> , $J = 5,9$ Hz)	122,4	CH	6	5
8	-	142,3	C	-	6, 11, 28
9	-	147,6	C	-	12a, 12b, 19
10	-	37,5	C	-	11, 19
11	5,31 (<i>d</i> , $J = 5,9$ Hz)	117,2	CH	12	12a, 12 b
12a	2,29 (<i>d</i> , $J = 17,9$ Hz)	39,8	CH_2	11	18
12b	2,03 (<i>m</i>)				
13	-	44,4	C	-	12,18, 28
14	-	52,5	C	-	12, 18, 28
15	4,26 (<i>dd</i> , $J = 9,5$; 6,1 Hz)	74,9	CH	16a, 16b	15, 17
16a	1,96 (<i>m</i>)	40,2	CH_2	17	20
16b	1,75 (<i>dd</i> , $J = 10,1$; 5,9 Hz)				
17	-	49,0	CH	16	18, 20, 21
18	0,61 (<i>s</i>)	16,2	CH_3	-	12, 14
19	0,98 (<i>s</i>)	23,0	CH_3	-	1, 5
20	1,35 (<i>m</i> ,)	35,8	CH	17, 22	16, 21, 22, 23
21	0,85 (<i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)	18,5	CH_3	-	17,20,22 ,
22	-	36,3	CH_2	23	24
23	-	23,5	CH_2	22, 24	20, 21, 22,
24	5,07 (<i>t</i> , $J = 7,1$ Hz)	126,0	CH	23	26, 27
25	-	131,3	C	-	24, 26, 27
26	1,68 (<i>s</i>)	17,8	CH_3	-	24, 27
27	1,60 (, <i>s</i>)	25,8	CH_3	-	24, 26
28	0,94 (<i>s</i>)	28,9	CH_3	-	15
29	1,00 (<i>s</i>)	15,9	CH_3	-	3, 5
30	0,88 (<i>s</i>)	17,2	CH_3	-	3, 5

A análise pormenorizada dos espectros bidimensionais de COSY e HMQC, confirmou a caracterização estrutural do composto. Da experiência de COSY foi possível estabelecer quatro fragmentos estruturais (Figura 2.20), dos quais, quatro no esqueleto tetracíclico e um na cadeia lateral. O fragmento mais relevante (Figura 2.20) resultou da homocorrelação entre os prótons da cadeia lateral, H_{21}/H_{20} , H_{20}/H_{22} , H_{22}/H_{23} e H_{23}/H_{24} , e dedução de uma terminação do tipo isopropilo.

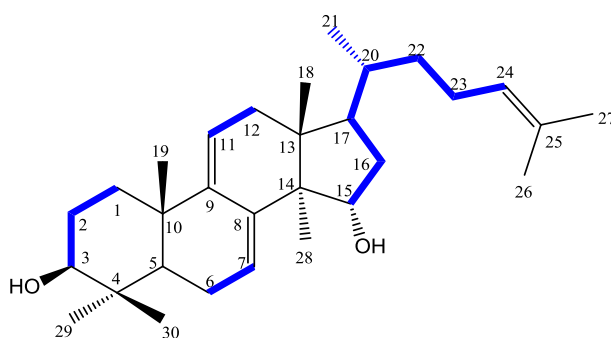


Figura 2.20: Fragmentos estruturais estabelecidos através das experiências de COSY e HMQC do composto **2.8**.

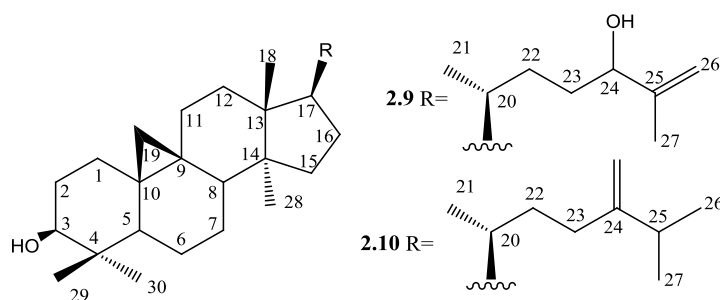
Este composto foi identificado em algumas espécies da família *Annonaceae* (Hamonniere *et al.* 1976), incluindo o *Cleistochlamys kirkii* (Samwel *et al.*, 2007). Os dados obtidos foram concordantes com os descritos na literatura (Hamonniere *et al.*, 1976).

2.1.1.4.2. Derivados do esqueleto cicloartano

Os cicloartanos são compostos designados por 9,19-ciclolanoanos e caracterizam-se pela presença de um anel do ciclopropano na molécula.

2.1.1.4.2.1. *Cicloart-25-eno-3 β ,24-diol* **2.9** e *24-metilenocicloartanol* **2.10**

Os compostos **2.9** e **2.10**, obtidos em mistura com o composto e a partir da fração **B₄**, foram identificados como sendo derivados do cicloartano.



Nos espectros de IV, observaram-se uma banda a 3460 cm^{-1} característica do grupo hidroxilo.

O anel de ciclopropano (9,19 β), característico dos cicloartanos apresentou características espectroscópicas particulares, nomeadamente dois sinais a campo muito alto e com valores de δ_{H} de 0,33 (*d*, $J = 3,9\text{ Hz}$) e 0,56 (1H, $J = 4,0\text{ Hz}$), atribuíveis a H₁₉ (cf. Tabela 2.10).

Tabela 2.10: Espectros de ^1H -RMN [400 MHz (1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] dos compostos **2.9** e **2.10**.

Posição	^1H
	2.9/2.10
3	3,25 (<i>dd</i> , $J = 11,0; 4,5\text{ Hz}$)
18	0,97 (<i>s</i>)
19a	0,56 (<i>d</i> , $J = 4,0\text{ Hz}$)
19b	0,33(<i>d</i> , $J = 3,9\text{ Hz}$)
28	0,88 (<i>s</i>)
29	0,96 (<i>s</i>)
30	0,81(<i>s</i>)

A análise do espectro de ^1H -RMN permitiu identificar um conjunto de sinais compatíveis com o esqueleto do cicloartano presente em **2.9** e **2.10** (Tabela 2.12), nomeadamente, a existência de um duplo duplete a δ_{H} 3,25 ($J = 11,0; 4,5\text{ Hz}$, H₃) e um tripleto a 3,64 ($J = 6,4\text{ Hz}$),H₂₄) (cf. Tabela 2.10), que foram suportados pela presença dos oximetinos a δ_{C} 79,1 e 72,2 no espectro de ^{13}C -RMN (cf Tabela 2.11).

Tabela 2.11: Principais diferenças nos espectros de ^1H , ^{13}C - RMN e DEPT [400 MHz (1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] dos compostos **2.9** e **2.10**.

Posição	2.9			2.10		
	^1H	^{13}C	DEPT	^1H	^{13}C	DEPT
21	0,87 (<i>d</i> , $J = 5,4\text{ Hz}$)	18,3	CH ₃	0,89 (<i>d</i> , $J = 4,0\text{ Hz}$)	18,3	CH ₃
24	3,64 (<i>t</i> , $J = 6,4\text{ Hz}$)	72,2	CH	-	147	C
25	-	147,0	C	-	33,8	CH
26a	4,90 (<i>s largo</i>)			1,03 (<i>d</i> , $J = 6,8\text{ Hz}$)	21,9	CH ₃
26b	4,87 (<i>s largo</i>)	110,9	CH			
27	1,75 (<i>s</i>)	18,4	CH ₃	1,02 (<i>d</i> , $J = 6,8\text{ Hz}$)	18,4	CH ₃
31a	-	-	-	4,66 (<i>s largo</i>)	110,	CH
31b	-	-	-	4,71 (<i>s largo</i>)	9	

A existência de uma dupla ligação terminal, no composto **2.9**, foi suportada pela observação de um grupo metileno terminal cujos prótons ressoaram a δ_H 4,90 (s, H_{26a}); 4,87 (s, H_{26b}) no espectro de ¹H-RMN e confirmada pela presença no espectro de RMN ¹³C de dois carbonos olefínicos a δ_C 147,0 (C₂₅) e 110,9 (C₂₆) atribuíveis à dupla ligação $\Delta^{25,26}$. No caso do composto **2.10** foram observados dois singletos largos a δ_H a 4,66 e 4,71 ppm correspondentes no espectro de ¹³C-RMN aos carbonos olefínicos δ_C a 147,3 e 106,4 ppm, atribuíveis a dupla ligação $\Delta^{24,31}$ (cf. Tabela 2.11).

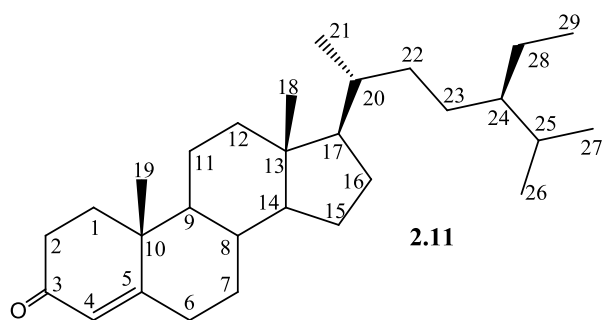
Tabela 2.12: Espectros de ¹³C- RMN e DEPT [400 MHz (¹H), 101 MHz (¹³C), CDCl₃, (ppm), (*J* em Hz)] do composto **2.9** e **2.10**.

Posição	2.9/2.10		Posição	2.9/2.10	
	¹³ C	DEPT		¹³ C	DEPT
1	32,0	CH ₂	16	26,6	CH ₂
2	26,6	CH ₂	17	50,5	CH
3	79,1	CH	18	17,7	CH ₃
4	39,4	C	19	29,8	CH ₂
5	48,6	CH	20	35,8	CH
7	28,1	CH ₂	22	30,9	CH ₂
8	48,6	CH	23	29,4	CH ₂
13	45,3	C	28	19,2	CH ₃
14	48,6	C	29	25,0	CH ₃
15	35,4	CH ₂	30	15,5	CH ₃

Os dados obtidos foram compatíveis com os discutidos na literatura para estes compostos (Chaves *et al.*, 2004; Palmeira Júnior, *et al.*, 2006).

2.1.1.4.3. β -sitostenona

O composto **2.11**, isolado a partir da fração **B₅**, é um fitosterol que possui uma cadeia lateral alquilada em C₂₄ incluindo-se no grupo dos 24-etil-colestanos (Madureira, 2004) .



A sua fórmula molecular, $C_{29}H_{48}O$, deduzida a partir do espectro de ^{13}C -RMN. O IDH calculado de seis é concordante com a presença de quatro anéis e um sistema α,β -insaturado.

Este composto, quando aplicado em TLC e exposto à luz UV (λ 254 nm) apresentava uma forte absorção, o que indicou a existência de um sistema conjugado. Tal foi comprovado pela presença no espectro de IV de uma banda de absorção a 1677 cm^{-1} , característica de um grupo carbonilo $\alpha\beta$ -insaturado, no espectro de 1H -RMN de um próton olefínico a δ_H 5,72. Estes dados, associadas à presença dos sinais no espectro de ^{13}C -RMN a δ_C 123,8 (C_4) e a δ_C 138,2 (C_5) evidenciaram a existência de uma cetona $\alpha\beta$ -insaturada (cf. Tabela 2.13).

A presença de dois duplos dupletos a δ_H 2,37 e 2,43, atribuíveis a H_2 , validam a presença de um grupo carbonilo em C_3 (δ_C 199,8 ppm).

O espectro de 1H -RMN exibiu sinais correspondentes a seis grupos metilo, dois ligados a carbonos totalmente substituídos a δ_H 0,71 (*s*, H_{18}) e 1,17 ppm (*s*, H_{19}), três ligados a carbonos secundários δ_H 0,92 (*d*, $J = 6,3\text{ Hz}$, H_{21}), 0,84 (*s largo*, H_{26}) e 0,81 (*s largo*, H_{27}) e um ligado a um grupo metileno δ_H 0,86 (*t*, H_{29}) (c.f Tabela 2.13).

O sinal de um próton olefínico a δ_H 5,72 (H_4), associado aos sinais no espectro de ^{13}C -RMN a δ_C 123,8 (C_4) e a δ_C 138,2 (C_5), característicos dos esteroides insaturados em $\Delta^{5,6}$, evidenciaram a existência de uma dupla ligação localizada nos referidos carbonos.

Tabela 2.13: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.11**

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
1	-	35,8	CH_2	2	2, 19
2a	2,37 (d , $J = 4,9$ Hz)	34,1	CH_2	1	
2b	2,43 (d , $J = 4,9$ Hz)				
3	-	199,8	C	-	1, 2a, 2b, 4
4	5,72 (s largo),	123,8	CH	-	6
5	-	138,2	C	-	6
6	-	33,0	CH_2	7	4
7	-	32,1	CH_2	8	-
8	-	32,1	CH	7, 9, 14	-
9	-	53,9	CH	8, 11	-
10	-	38,7	C	-	19
11	-	21,1	CH_2	-	-
12	-	39,7	CH_2	-	-
13	-	42,5	C	-	18
14	-	56,0	CH	-	-
15	-	24,3	CH_2	-	-
16	-	28,3	CH_2	-	-
17	-	56,1	CH	-	-
18	0,71 (s)	11,9	CH_3	-	-
19	1,17 (s)	17,5	CH_3	-	-
20		36,2	CH	-	-
21	0,92 (d , $J = 6,3$ Hz)	18,5	CH_3	-	-
22	-	34,0	CH_2	-	-
23	-	26,2	CH_2	-	-
24	-	45,9	CH_2	-	-
25	-	29,2	CH	-	-
26	0,84 (d , $J = 6,3$ Hz)	19,9	CH_3	-	-
27	0,81 (d , $J = 6,3$ Hz),	19,1	CH_3	-	-
28	-	23,1	CH_2	29	-
29	0,86 (t , $J = 6,3$ Hz)	12,09	CH_3	-	-

O espectro de ^{13}C -RMN indicou a presença de 29 carbonos: quatro carbonos quaternários, sendo um deles um carbono carbonílico (C_3) e outro olefínico, doze grupos metilenos, oito grupos metinos e seis grupos metilo (Tabela 2.13)

A presença de seis grupos metilo, dois ligados a carbonos totalmente substituídos, três ligados a carbonos secundários (dupletos a δ_H 0,92, 0,84 e 0,81 atribuídos respectivamente aos C₂₁, C₂₆ e C₂₇) e um ligado a um grupo metileno (triplete a δ_H 0,86; $J = 6,3$ Hz) atribuído ao C₂₉ completam a referida atribuição estrutural

As principais heterocorrelações observadas no espectro de HMBC estão esquematizadas na figura 2.21. Destas destacam-se as correlação entre o C₃ e o H_{2a}, H_{2b}, H₁ e o H₄, também as correlações do C₄/H₆ e C₅/H₁₉ e C₅/H₁, permitiram confirmar a posição da enona (Figura 2.21).

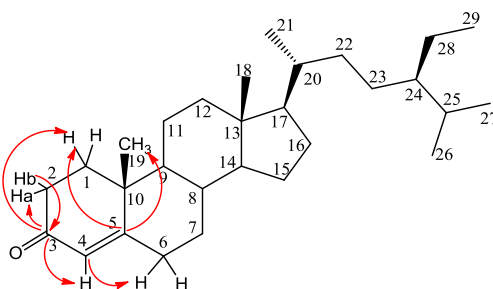


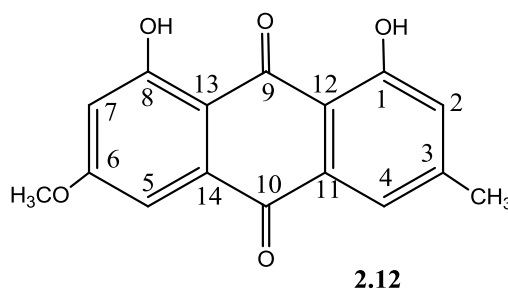
Figura 2.21: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto **2.11**.

A identidade do composto foi confirmada pela comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (Greca, *et al.*, 1990).

2.1.1.5 Outras estruturas

2.1.1.5.1. Phycion

O composto **2.12**, isolado a partir da fração **B2**, é uma antraquinona que foi identificada como sendo o *Phycion* (Smetanina *et al.*, 2007).



A sua fórmula molecular, C₁₆H₁₂O₅, foi deduzida a partir do espectro de ¹³C-RMN, sendo o seu IDH de onze, compatível com a presença de três anéis, dois dos quais aromáticos, e dois grupos carbonilo.

Nos espectros de IV, observou-se uma banda a 3447 cm^{-1} característica do grupo hidroxilo, como também duas bandas a 1628 e 1614 cm^{-1} característica das vibrações dos grupos C=O duplamente conjugados (Koyama, *et al.*, 2001; Pavia, *et al.*, 2001).

O espectro de ^{13}C -RMN apresentou dezasseis sinais dos quais dois eram carbonos carbonílicos, a $\delta_{\text{C}} 190,9$ (C_9) e $\delta_{\text{C}} 182,1$ ppm (C_{10}). Apresentou igualmente dois grupos metilo, um deles ligados a oxigénio a $\delta_{\text{C}} 56,2$ (6-OCH_3), e doze carbonos aromáticos de dois anéis benzénicos.

Tabela 2.14: Espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (^1H), 101 MHz (^{13}C), CDCl_3 , (ppm), (J em Hz)] do composto **2.12**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC
1	-	162,6	C	-	1-OH, 2
2	7,08 (d , $J = 0,8$ Hz)	124,6	CH	4	1-OH, 4, 15
3	-	148,5	C	-	2,4,15
4	7,63 (d , $J = 0,8$ Hz)	123,8	CH	-	2, 15
5	7,37 (d , $J = 2,6$ Hz)	108,3	CH	7	7
6	-	166,6	C	-	5, 7
7	6,69 (d , $J = 2,6$ Hz)	106,9	CH	5	5,8-OH
8	-	165,3	C	-	7, 8-OH
9	-	190,9	C	-	-
10	-	182,1	C	-	4
11	-	133,3	C	-	4
12	-	113,5	C	-	1-OH, 2
13	-	110,3	C	-	7, 8-OH
14	-	135,3	C	-	5
3-CH₃	2,45 (s)	24,3	CH ₃	-	2, 4
6-OCH₃	3,94 (s)	56,2	CH ₃	-	-
1-OH	12,22 (s)	-	-	-	-
8-OH	12,32 (s)	-	-	-	-

No espectro de ^1H -RMN observaram-se dois sinais a campo muito baixo a $\delta_{\text{H}} 12,22$ (1-OH) e $12,32$ (8-OH) ppm que indicaram a presença de dois grupos OH fenólicos na molécula. Observaram-se ainda dois singuletos que integram para três prótons a $\delta_{\text{H}} 2,45$ (3-CH₃) e $3,94$ ppm (6-OCH₃) correspondentes a grupos metilo sendo o último um grupo metoxi. Também se observaram na zona dos prótons aromáticos, os sinais a $\delta_{\text{H}} 7,08$ (d , $J = 0,8$ Hz, H_2), $7,63$ (d , $J = 0,8$ Hz, H_4), $7,37$ (d , $J = 2,6$ Hz, H_5) e $6,69$ (d , $J = 2,6$ Hz, H_7), correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos.

As principais heterocorrelações observadas no espectro de HMBC, que permitiram definir a estrutura do composto **2.12**, estão esquematizadas na figura 2.22. Destas, destacam-se as correlações entre o C₁/H₂ e o 1-OH, C₂/1-OH/H₄ e o 3-CH₃, e também as correlações do C₈/H₇ e 8-OH, C₁₀/H₄ e H₅.

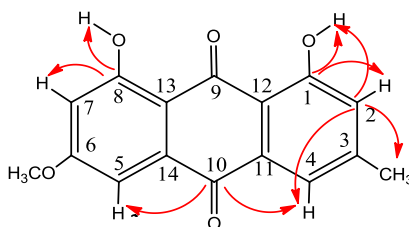
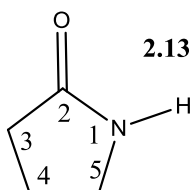


Figura 2.22: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto **2.12**.

Os dados obtidos são compatíveis com os descritos na literatura para o *phycion* (Smetanina *et al.*, 2007).

2.1.1.5.2 Butirolactama

O composto **2.13**, isolado a partir da fração N₆, foi identificado como sendo a butirolactama.



A sua fórmula molecular, C₄H₇ON, IDH de dois, deduzida a partir do espectro de ¹³C-RMN é compatível com a presença a estrutura de uma γ -lactama.

No espectro de IV, observou-se uma banda a 3378 cm⁻¹ característica do grupo NH e também uma banda a 1730 cm⁻¹, característica das vibrações do grupo C=O.

O espectro de ¹³C-RMN apresentou quatro sinais, sendo um deles um carbono carbonílico a δ_C 177,1 (C₂) e três grupos metilenos a δ_C 16,9 (C₄), 33,2 (C₃) e 45,4 (C₅).

Tabela 2.15: Espectros de RMN ¹H, ¹³C e DEPT e correlações observadas nas experiências de COSY, HMQC e HMBC [300 MHz (1H), 101 MHz (13C), CDCl₃, (ppm), (J em Hz)] do composto **2.13**.

Posição	¹ H	¹³ C	DEPT	COSY	HMBC
---------	----------------	-----------------	------	------	------

2	-	177,1	C	-	3,4, 5
3	2,59 (<i>m</i>)	33,2	CH ₂	4	4, 5
4	2,01 (<i>m</i>)	16,9	CH ₂	3, 5	3, 5
5	3,82 (<i>m</i>)	45,4	CH ₂	4	3, 4
NH	8,17(s)	-	-	-	-

O espectro de ¹H RMN indicou a presença de três grupos metileno a δ_H 2,59 (H₃), 2,01 (H₄) e um metileno a campo mais baixo a δ_H 3,82 (H₄) devido a proximidade ao hetero-átomo. Estes prótons correlacionam – se entre si, como podemos verificar no espectro de COSY, figura 2.23.

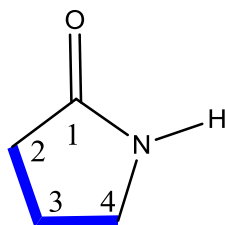


Figura 2.23: Fragmentos estruturais estabelecidos através das experiências de COSY e HMQC do composto **2.13**.

O espectro de HMBC, mostrou as principais heterocorrelações que permitiram validar a estrutura do composto, (Figura 2.24). Destas realçam-se as correlações entre C₁ e os prótons H₂ e H₃.

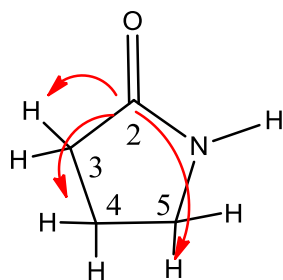


Figura 2.24: Principais correlações observadas no espectro de HMBC do composto **2.13**.

2.2. Atividade antibacteriana

As doenças infecciosas são patologias causadas por bactérias, vírus, parasitas e fungos numa interação complexa entre o microrganismo, hospedeiro e o ambiente. A descoberta dos antibióticos no século passado foi um marco determinante no tratamento destas patologias. No entanto o uso indiscriminado dos antibióticos conduziu ao desenvolvimento de fenómenos de resistência (Hamaishwarya, *et al.*, 2008).

A resistência aos antibióticos pode ser natural, quando ocorre uma mutação espontânea, ou adquirida, através da transferência de fragmentos de ADN entre bactérias da mesma espécie ou entre diferentes espécies (Chung, *et al.*, 2011).

As bactérias desenvolvem mecanismos de resistências que impedem os antibióticos de atuar, nomeadamente (Figura 2.25): i) aumento do efluxo do agente antibacteriano (bombas de efluxo); ii) alteração na conformação do local de ligação do antibiótico, resultando numa diminuição na eficácia da ligação; iii) presença de enzimas que inativam o agente antibacteriano; iv) a redução de absorção do agente antibacteriano por parte da bactéria (Wagner, 2008).

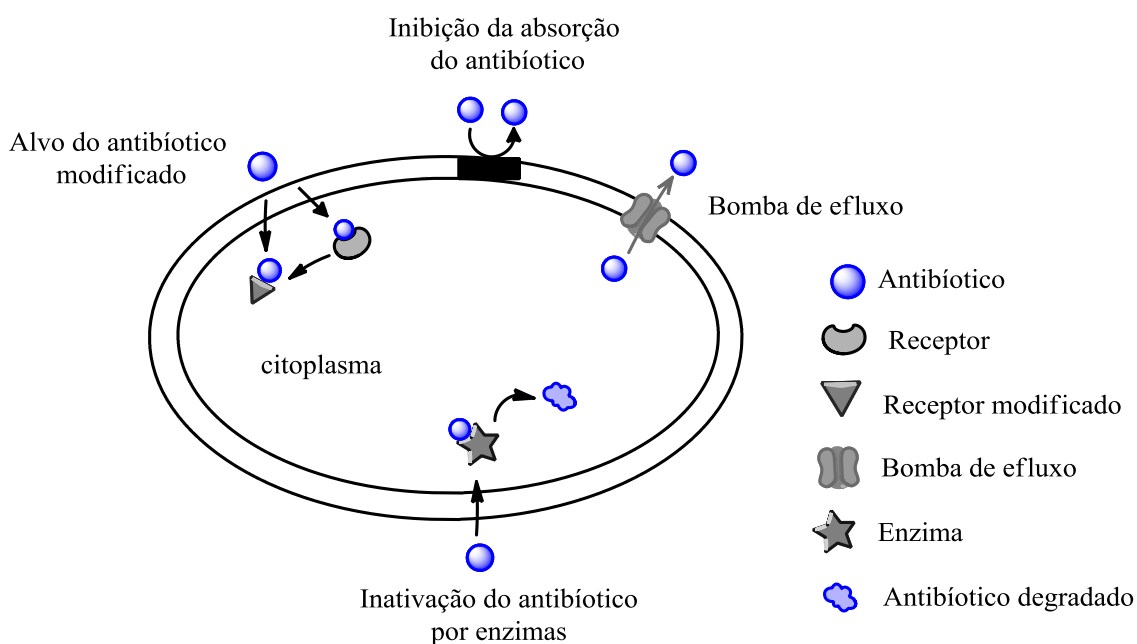


Figura 2.25: Mecanismos de resistência aos antibióticos.

Os produtos naturais, nomeadamente provenientes de plantas, têm sido uma importante fonte de moléculas com atividade antibacteriana, pois produzem uma variedade de metabolitos secundários que têm como função proteger a planta contra

microrganismos. Estes metabolitos secundários são fontes promissoras de novos compostos bioativos como potenciais agentes terapêuticos, incluindo agentes antimicrobianos (Chung, *et al.*, 2011).

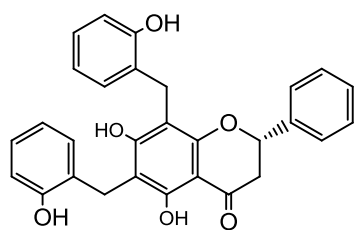
Nesta dissertação, procedemos à avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos isolados (2.1-2.13) de *C. kirkii* através da determinação das respectivas concentrações mínimas inibitórias. Realizam-se ainda ensaios para avaliar a eventual interação entre os compostos isolados neste trabalho (2.2, 2.3, 2.6, 2.8) e em trabalhos anteriores (2.14 e 2.15) (Monteiro, 2014), (2.21-2.23) (Pereira *et al.*, 2016) e compostos de síntese, derivados a partir da dichamanetina (2.16 – 2.20 e 2.24-2.26) (Monteiro, 2014), com alguns dos antibióticos de referência usados no tratamento de infecções do *S. aureus*. Pretendeu-se determinar a existência de uma relação sinérgica entre estes e deste modo determinar a sua capacidade de modular ou reverter os fenómenos de resistências observadas nestas espécies.

2.2.1. Determinação da concentração mínima inibitória dos compostos isolados

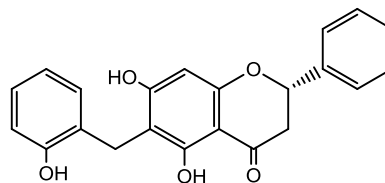
Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos utilizando um painel selecionado de estirpes de bactérias de *S. aureus*. A CMI corresponde à menor concentração de amostra que inibe o crescimento bacteriano. O método utilizado para determinar a CMI, foi o da microdiluição em meio líquido, tendo a atividade dos compostos sido avaliada numa gama de concentrações entre 500-0,5 µg/mL.

Os compostos 2.1-2.13, foram ensaiadas sobre um painel de bactérias Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (MSSA), ATCC 9144 e ATCC 43866 (MRSA), CIP 106760 e CIP 106414 (VISA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e em estirpes Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.16.

Os melhores resultados foram observados para as flavanonas C-benziladas, nomeadamente a dichamanetina (2.2) e a isochamanetina (2.3) que exibiram valores de CMI de 1 e 4 µg.mL⁻¹ nas estirpes resistentes MRSA e de 2 e 4 µg/mL nas estirpes sensível e VISA, respetivamente. A isochamanetina (2.3) também inibiu o crescimento bacteriano da *S. epidermis* (CMI = 30 µg/mL) e do *Bacillus subtilis* (CMI = 8µg/mL).

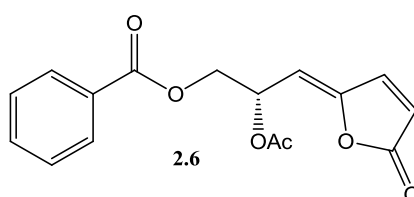


2.2



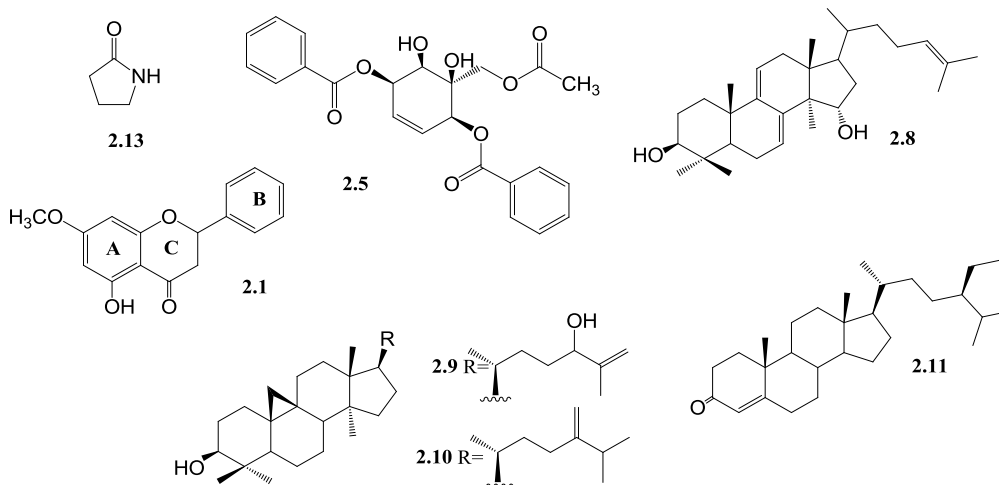
2.3

O derivado de heptano o (R)-(*E*)-acetilmelodorinol **2.6** apresentou uma atividade antibacteriana significativa nas estirpes sensível (CMI = 15 $\mu\text{g/mL}$) e VISA (CMI= 31 e 62 $\mu\text{g/mL}$), enquanto na estirpe MRSA apresentou uma fraca atividade antibacteriana (CMI de 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).



2.6

O kirkiinol (**2.5**), o poliocarpol (**2.8**), derivados de cicloartano (**2.8/2.9**) a β -sitostenona (**2.10**), a pinostrobin (**2.1**) e a butirolactama (**2.13**), exibiram uma fraca atividade inibitória do crescimento bacteriano com valores de CMI de 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as estirpes sensíveis e resistentes MRSA e VISA.



Não foram observadas quaisquer atividades nas estirpes Gram-negativas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. typhimurium* ATCC 1311.

Tabela 2.16: Concentração mínima inibitória (CMI µg/ mL) dos compostos isolados de *C. kirkii*.

Bactéria	CMI (µg/mL)								
	<i>S. aureus</i>					<i>S. epidermis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
	MSSA	MRSA		VISA		ATCC 1228	ATCC 6633	ATCC 9027	ATCC 13311
	ATCC 6538	ATCC 43866	ATCC 9144	CIP 106414	CIP 106706				
Pinostrobin (2.1)	>250	>250	>250	>250	>250	>250	-	-	-
Dichamanetina (2.2)	2	1	1	2	-	-	4	>250	>250
Isochamanetina (2.3)	4	8	4	4	15	31	8	15	15
kirkiinol (2.5)	250	250	250	250	125	125	-	>250	>250
(R)-(E)-Acetilmelodorinol (2.6)	15	250	250	62	31	125	125	>250	>250
Cleistonol 2.7	250	>250	>250	125	125	125	-	>250	>250
Policarpol (2.8)	250	250	125	-	-	-	>250	>250	>250
Cicloart-25-eno-3β,24-dio (2.9)	125	250	250	250	125	125	-	>250	>250
e									
24-metilenocicloartanol (2.10)									
β-sitostenona (2.11)	250	250	>250	250	125	125	-	>250	>250
Butirolactama (2.13)	250	250	250	250	250	125	-	>250	>250
Amoxicilina	0,2	62	250	15	30	250	0,2	-	-
Oxacilina	0,2	125	125	125	500	7,5	0,8	-	-

A comparação entre os resultados obtidos para o esqueleto flavanoide base (pinostrobin 2.1) e os seus derivados C-benzilados permitiram concluir que a presença de dois grupos benzilo é importante para a atividade antibacteriana das flavanonas. A substituição do grupo benzilo em C₈ da dichamanetina (2.2) por um protão na isochamanetina (2.3) levou a uma redução da atividade da molécula pelo que podemos concluir que o referido grupo interfere na atividade antibacteriana. As diferenças observadas nos valores da CMI dos compostos 2.1-2.3 está dependente do número de grupos benzoilo presentes na molécula (que mudam as propriedades físico-químicas, nomeadamente o carácter lipofílico), e da sua localização no anel A da flavanona. A dichamanetina (2.2), mais lipofílica (Log P = 6,31) por apresentar dois grupos benzilo, foi o composto mais ativo. Esta constatação está de acordo com estudos realizados anteriormente que revelaram que a presença de grupos lipofílicos nas posições C₆ e C₈ do esqueleto flavanoide melhora a atividade antibacteriana (Xie *et al.*, 2015).

Embora, a atividade antibacteriana da dichamanetina já havia sido retratada anteriormente por alguns autores (Urgaonkar *et al.*, 2005), nunca havia sido descrita a sua atividade para estirpes multiresistentes, um grande problema atual da saúde pública.

Para além da atividade antibacteriana, alguns trabalhos muito recentes revelaram que este composto também exibe atividade sobre algumas espécies de fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Kongstad, *et al.*, 2015), assim como atividade antitumoral sobre várias linhas celulares humanas (Yong *et al.*, 2013).

2.2.2. Avaliação da interação entre os compostos obtidos e alguns antibióticos de referência

Ao longo dos tempos, o homem têm recorrido às plantas como forma de tratar numerosas alterações de natureza microbiana. Os estudos fitoquímicos realizados para validar esta aplicação não têm levado ao isolamento de muitos compostos bioativos. Com efeito, na maioria dos casos, a atividade antimicrobiana dos compostos isolados muitas vezes não justificava a atividade observadas nos extratos. Nos últimos anos o conceito de interação entre os componentes de uma planta, seja esta do tipo sinérgica, antagonista ou aditiva, tem se revelado particularmente interessante e despertado o interesse da comunidade científica (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2008).

Um exemplo de sinergismo é a administração simultânea de inibidores de β -lactamases juntamente com o antibiótico β -lactâmico, com o objetivo de melhorar a eficácia destes (Hamaiswarya, *et al.*, 2008).

As moléculas quando combinadas desempenham o seu efeito sinérgico através dos seguintes mecanismos:

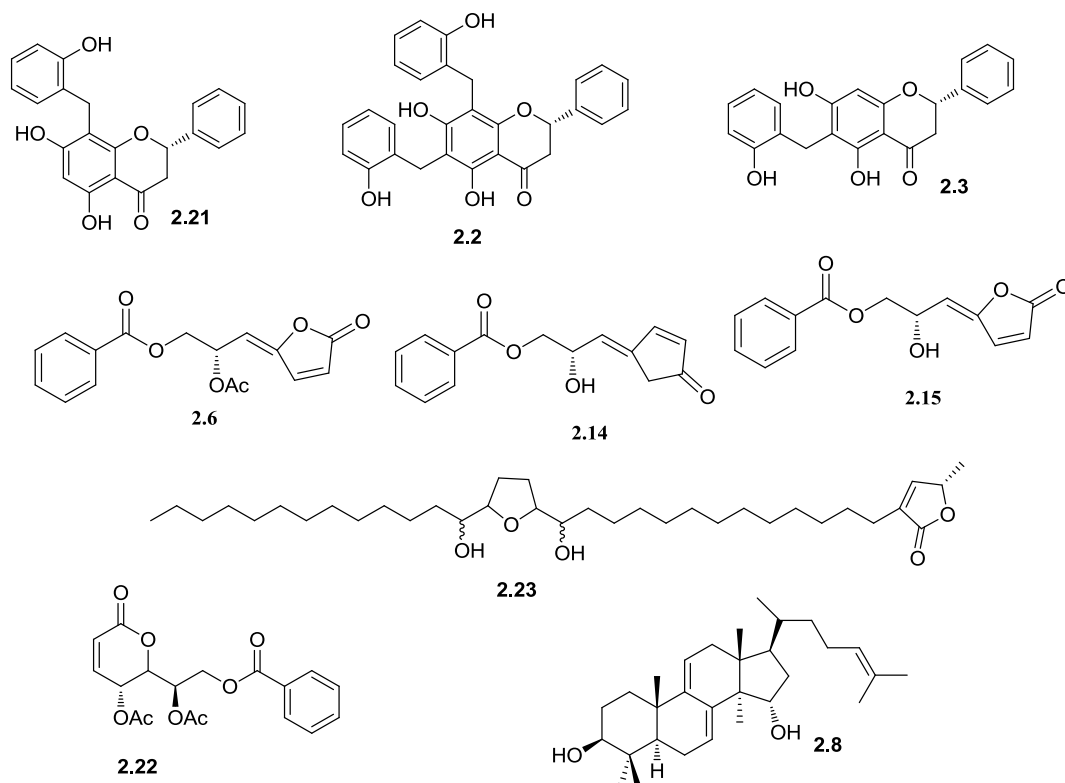
- Os compostos atuam em vários alvos (enzimas, substratos, metabolitos e proteínas receptores, canais iônicos, proteínas transportadoras; etc) aumentando assim seu efeito agonista;
- Aumento da solubilidade e reabsorção, aumentando assim a biodisponibilidade do composto;
- Interação com agentes bacterianos com mecanismos de resistência;
- Eliminação ou neutralização de efeitos adversos (Hamaiswarya, *et al.*, 2008).

Com o objetivo de avaliar as interações entre alguns dos compostos isolados de *C. kirkii* (2.2, 2.3, 2.6, 2.8, 2.14 , 2.15 e 2.21-2.23), assim como dos derivados de síntese (2.16-2.20 e 2.24-2.26) procedeu-se à determinação das CMI da amoxicilina e da oxacilina, antibióticos de referência usados no tratamento de infecções com *Staphylococcus aureus*. Incluiu-se ainda a vancomicina, um antibiótico de 2º linha usado para o tratamento de estirpes MRSA para o qual algumas estirpes começaram a apresentar resistência (VISA). Pretendeu-se determinar se os compostos eram capazes de modular a atividade do antibiótico, e qual o tipo de interação entre eles (sinergismo, antagonismo ou indiferença), quando testados nas estirpes de *S aureus* MSSA, MRSA e VISA.

A interação entre dois agentes antimicrobianos é expressa pelo valor do índice da concentração mínima inibitória fracional (FICI), que é a soma do FIC de cada composto individual com o FIC do antibiótico. O FIC de cada composto é calculado dividindo a concentração mínima inibitória (CMI) do composto quando combinado com o antibiótico pela CMI do composto sem a presença de antibiótico. Assim quando o valor de FICI é igual ou inferior à 0,5, há uma interação sinérgica. Quando o valor de FICI se encontra entre 0,5 e 4,0, não há interação entre o composto e o antibiótico e quando o valor é maior que 4 ocorre um efeito antagonista (Al-Ani, *et al.*, 2015).

2.2.3.1. Compostos de origem natural

As Tabelas 2.17 e 2.18 apresentam os resultados obtidos (CMI e FICI) nos ensaios de combinação entre os compostos isolados e os antibióticos selecionados para as estirpes de *S. aureus* (sensível ATCC 6538, e resistentes MRSA ATCC 9144 e CIP 106414).



Como podemos verificar (Tabela 2.16), para a estirpe sensível ATCC 6538 observou-se sinergismo entre os compostos ensaiados e os antibióticos, com valores de FICI entre 0,02 e 0,19. O policarpol (**2.8**) exibiu o melhor efeito sinérgico quando combinado com a oxacilina (FICI = 0,02) e a amoxicilina (FICI = 0,04). O (*R*)-(*Z*)-melodorinol (**2.14**), (*R*)-(*E*)-melodorinol (**2.15**) e o (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) exibiram um valor de FICI de 0,07, quando combinadas com a oxacilina e a amoxicilina, respectivamente. A CMI do composto **2.6** diminui de 15 para 0,5 µg/mL (FIC = 0,031), enquanto que para os compostos **2.14** e **2.15** se observou um decréscimo de 62 para 3,5 µg/mL (FIC = 0,062) e (FIC= 0,030), respectivamente. O cleistenolido (**2.22**) exibiu efeito sinérgico apenas quando combinado com a amoxicilina (FICI= 0,19), o que corresponde a uma redução da CMI de 30 para 3,75 µg/mL.

Tabela 2.17: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos isolados e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe sensível *S. aureus* ATCC 6538.

Estirpe <i>S. aureus</i>	Composto	CMI (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
		Sozinho	Combinado			
ATCC 6538	2.2	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.2	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.6	15	0,5	0,031	0,07	Sinergismo
	Amoxacilina	0,2	0,007	0,038		
	2.6	15	3,5	0,031	0,18	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,003	0,15		
	2.8	250	7,5	0,03	0,04	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,0015	0,0075		
	2.8	250	1,75	0,007	0,02	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,003	0,015		
	2.14^A	62	7,5	0,12	0,16	Sinergismo
	Amoxicilina ^B	0,2	0,0076	0,038		
	2.14	62	3,5	0,062	0,07	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,015	0,075		
	2.15	62	7,5	0,125	0,14	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,003	0,019		
	2.15	62	3,5	0,030	0,07	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,007	0,038		
	2.21	8	4	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.21	8	4	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.22	30	3,75	0,125	0,19	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,0125	0,0625		
	2.22	30	15	0,5	1,00	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,1	0,5		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxacilina	0,2	0,2	1		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.8	250	15	0,06	0,19	Sinergismo

2.2	2	0,25	0,13
------------	---	------	------

Foi igualmente observado um efeito sinérgico para quase todos os compostos na estirpe MRSA ATCC 9144, com valores de FICI entre 0,11 e 0,5 (Tabela 2.18), com exceção dos compostos **2.6** e **2.22**. O policarpol (**2.8**) exibiu o melhor efeito sinérgico com valores de FICI de 0,11 e 0,18 quando combinado com a amoxicilina e a oxacilina, respetivamente. O (*R*)-(*E*)-melodorinol (**2.15**), quando combinado com a oxacilina, apresentou um FICI de 0,26, o que corresponde uma diminuição da CMI de quatro vezes. Para a estirpe VISA CIP 106414, também se observou um efeito sinérgico para os compostos **2.6**, **2.14** e **2.15** com valores de FICI entre 0,25 e 0,5, com exceção da combinação do composto **2.6** com a amoxicilina. O policarpol (**2.8**) exibiu um valor de FICI de 0,30 nas combinações com a amoxicilina e a oxacilina, e quando combinado com a vancomicina exibiu um valor de FICI de 0,24 o que corresponde a uma redução da CMI de 250 a 30 µg/mL.

Da análise dos resultados das interações dos compostos podemos afirmar que o policarpol (**2.8**), que sozinho não apresentava atividade antibacteriana, exibiu o melhor efeito sinérgico, com valores da FICI que variam entre 0,02 e 0,30. O que nos leva à conclusão que o policarpol pode reverter o fenómeno de resistência das estirpes resistentes de *S. aureus*. No entanto, o policarpol (**2.8**), quando combinada com a dichamanetina (**2.2**), exibiu sinergismo (FICI= 0,19), diminuindo a CMI de 2 a 0,25 µg/mL (Tabela 2.17).

Tabela 2.18: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos isolados e índice da concentração inibitória fracional (FICI) nas estirpes *S. aureus* resistentes (ATCC 9144 e CIP 106414).

Estirpe <i>S.aureus</i>	Composto	CMI (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
		Sozinho	Combinado			
MRSA	2.2	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.2	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.6	250	250	1,0	1,0	Indiferente
	Amoxacilina	250	0,44	$8,8 \times 10^{-4}$		
ATTC 9144	2.6	250	250	1,0	1,0	Indiferente
	Oxacilina	125	0,06	$9,8 \times 10^{-4}$		
	2.8	125	30	0.12	0.18	Sinergismo
	Amoxicilina	250	7.5	0.06		
	2.8	125	30	0.12	0.11	Sinergismo
	Oxacilina	125	1.5	0.24		
	2.14	250	125	0,5	0,50	Sinergismo
	Amoxacilina	250	7,5	0,015		
	2.14	250	125	0,5	0,50	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,12	$1,9 \times 10^{-3}$		
	2.15	250	125	0,5	0,50	Sinergismo
	Amoxacilina	250	0,44	$8,8 \times 10^{-4}$		
	2.15	250	62	0,25	0,26	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,10	0,015		
	2.21	30	15	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.21	30	15	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.22	7.5	3.75	0.50	1.50	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1.00		
	2.22	7.5	3.75	0.50	1.00	Indiferente
	Oxacilina	125	62	0.50		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxacilina	250	250	250		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
CIP 106414	2.2^A	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina ^B	15	15	1		
	2.2	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		

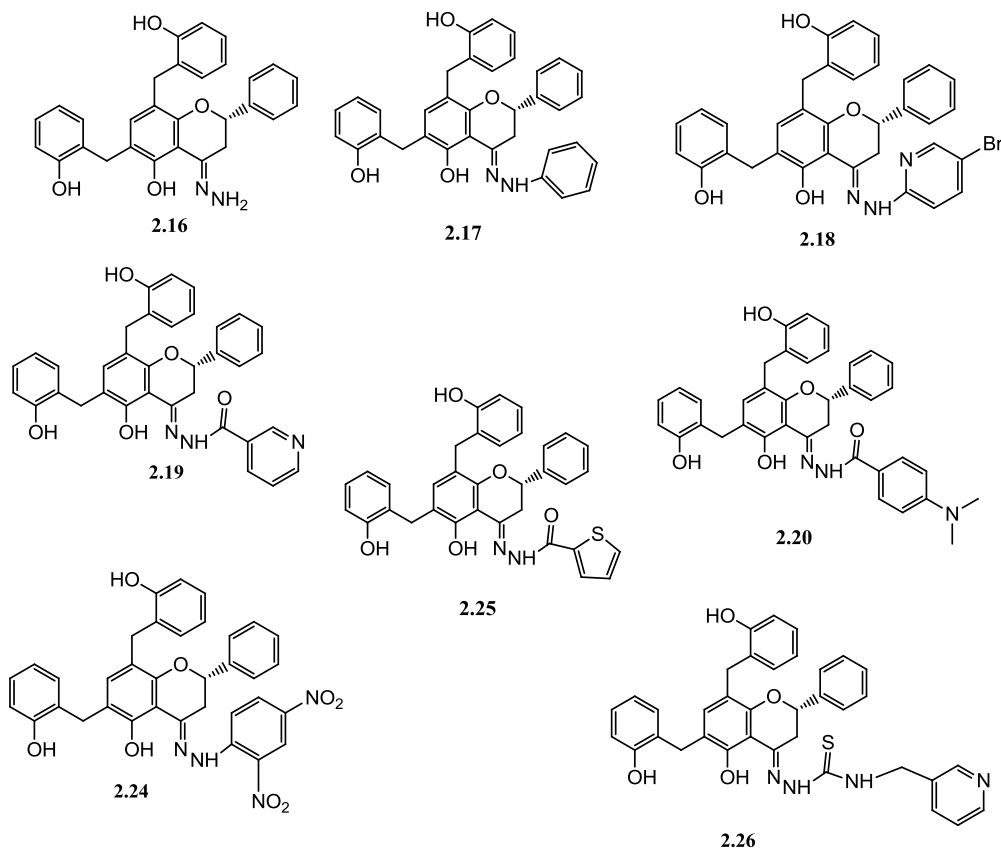
Tabela 2.18: (Continuação)

Estirpe <i>S.aureus</i>	Composto	CMI (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
		Sozinho	Combinado			
CIP 106414	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	15	15	1		
	2.3	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.6	62	31	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxacilina	15	15	1		
	2.6	62	15	0,25	0,5	Sinergismo
	Oxacilina	125	31	0,25		
	2.14	62	1,5	0,030	0,28	Sinergismo
	Amoxicilina	15	3,5	0,25		
	2.14	62	1,5	0,030	0,28	Sinergismo
	Oxacilina	125	31	0,24		
	2.15	250	62	0,25	0,25	Sinergismo
	Amoxacilina	15	0,015	$1,0 \times 10^{-3}$		
	2.15	250	62	0,25	0,25	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,12	$9,6 \times 10^{-4}$		
	2.21	62	31	0,5	1,5	
	Amoxicilina	15	15	1		
	2.21	62	31	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.22	30	15	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxacilina	15	15	1		
	2.22	30	15	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxacilina	15	15	1		
	2.23	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
CIP 106760	2.8	250	15	0.06	0.30	Sinergismo
	Amoxicilina	250	60	0.24		
	2.8	250	30	0.24	0.30	Sinergismo
	Oxacilina	250	15	0.06		
	2.8	250	30	0.12	0.24	Sinergismo
	Vancomicina	4	0.06	0.02		

2.2.3.2 Compostos de síntese derivados da dichamanetina

Sendo a dichamanetina o composto obtido em maior quantidade e simultaneamente o que apresentou maior atividade antibacteriana, procedeu-se, no grupo de produtos naturais, em que insere este trabalho, à síntese de um conjunto de derivados. Estes foram obtidos essencialmente pela manipulação do grupo carbonilo e sua derivatização em hidrazonas (2.16-2.18, 2.24) e semicarbazonas (2.18-2.20, 2.25 e 2.26). A CMI destes compostos havia sido anteriormente determinada por Monteiro, 2014 (Tabelas 2.19-2.21). Nesta dissertação pretendeu-se dar continuidade a este trabalho, avaliando as potenciais interações entre estes compostos de síntese e alguns

antibióticos de referência na inibição do crescimento de estirpes MSSA, MRSA e VISA.



Os resultados obtidos para a estirpe *S. aureus* MSSA (ATCC 6538), estão apresentados nas tabelas 2.19. Como podemos verificar da análise da referida tabela, o composto **2.18** foi o que apresentou valores de FICI menores quando combinado com a oxacilina e com a amoxicilina (FICI = 0,04 e 0,07), respetivamente. Estes valores correspondem uma redução de CMI da amoxicilina em 16 vezes (250 para 15 µg/mL) e da oxacilina em 33 vezes (250 para 7,5 µg/mL). O composto **2.20** também exibiu um bom efeito sinérgico com valores de FICI de 0,07 e 0,09, quando combinado com a oxacilina e amoxicilina, respetivamente.

Tabela 2.19: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe sensível *S. aureus* ATCC 6538.

Estirpe <i>S. aureus</i>	Composto	CMI (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
		Sozinho	Combinado			
ATCC 6538	2.16	2	0,05	0,025	0,10	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,015	0,075		
	2.16	2	0,05	0,025	0,33	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,06	0,300		
	2.17	30	0,8	0,027	0,10	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,015	0,075		
	2.17	30	0,8	0,027	0,18	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,03	0,150		
	2.18	250	15	0,060	0,07	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,002	0,010		
	2.18	250	7,5	0,030	0,04	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,002	0,010		
	2.19	3,5	1,5	0,429	0,58	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,03	0,150		
	2.19	3,5	1,5	0,429	0,73	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,06	0,300		
	2.20	250	15	0,060	0,09	Sinergismo
	Amoxicilina	0,2	0,005	0,025		
	2.20	250	15	0,060	0,07	Sinergismo
	Oxacilina	0,2	0,001	0,005		
	2.24	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.24	4	2	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.25	8	4	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.25	8	4	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		
	2.26	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	0,2	0,2	1		
	2.26	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	0,2	0,2	1		

A Tabela 2.20 apresenta os resultados das CMI obtidas com a combinação dos compostos 2.16- 2.20 e 2.24-2.26 e os antibióticos de referência para a estirpe *S. aureus* MRSA ATCC 9144. Como podemos verificar, apenas os compostos **2.19** e **2.20** foram efetivos nas duas combinações com a amoxilina e oxacilina. O composto **2.19** foi o que apresentou um valor de FICI menor ($FICI = 0,25$) para ambas as combinações com a amoxacilina e a oxacilina, o que corresponde a uma redução da CMI de 4 vezes (250 para 62 $\mu\text{g/mL}$). No entanto os compostos **2.17** e **2.18** apresentaram efeito sinérgico apenas para a oxacilina com valores de FICI de 0,5 e 0,37, respectivamente.

A Tabela 2.21 apresenta os resultados obtidos com a combinação dos compostos 2.16- 2.20 e 2.24-2.26 e os antibióticos de referência para a estirpe *S. aureus* VISA CIP 106414. Como podemos verificar, quase todos os compostos apresentaram sinergismo com valores de FICI entre 0,12 a 0,50, sendo que o composto 2.18 foi o que apresentou o menor valor de FICI ($FICI = 0,12$) quando combinado com a amoxacilina. Este valor corresponde a uma redução da CMI de 8 vezes (250 para 30 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2.20: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados da com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe resistente *S. aureus* ATCC 9144.

Estirpe <i>S. aureus</i>	Composto	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		FIC	FICI	Interpretação
		Sozinho	Combinado			
ATCC 9144	2.16	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.16	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	250	250	1		
	2.17	30	7,5	0,25	0,75	Indiferente
	Amoxicilina	250	125	0,5		
	2.17	30	15	0,5	0,50	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,06	0,00048		
	2.18	250	250	1	1,00	Indiferente
	Amoxicilina	250	0,5	0,002		
	2.18	250	62	0,248	0,37	Sinergismo
	Oxacilina	125	15	0,12		
	2.19	250	62	0,248	0,25	Sinergismo
	Amoxicilina	250	0,5	0,002		
	2.19	250	62	0,248	0,25	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,06	0,00048		
	2.20	250	125	0,5	0,50	Sinergismo
	Amoxicilina	250	0,5	0,002		
	2.20	250	125	0,5	0,50	Sinergismo
	Oxacilina	125	0,06	0,00048		
	2.24	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.24	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125-	1		
	2.25	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.25	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		
	2.26	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.26	250	125	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	125	125	1		

Tabela 2.21: Concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos sozinhos e combinados da com os compostos de síntese e índice da concentração inibitória fracional (FICI) na estirpe resistente *S. aureus* CIP 106414.

Estirpe <i>S. aureus</i>	Composto	CMI (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
CIP 106414		Sozinho	Combinado			
	2.16	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.16	1	0,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	250	250	1		
	2.17	15	3,50	0,23	0,26	Sinergismo
	Amoxicilina	250	7,50	0,03		
	2.17	15,00	0,80	0,05	0,30	Sinergismo
	Oxacilina	250	62,00	0,25		
	2.18	250	30,00	0,12	0,12	Sinergismo
	Amoxicilina	250	0,50	0,00		
	2.18	250	30,00	0,12	0,15	
	Oxacilina	250	7,50	0,03		Sinergismo
	2.19	3,50	1,50	0,43	0,43	
	Amoxicilina	250	0,02	0,00		Sinergismo
	2.19	3,50	0,80	0,23	0,23	Sinergismo
	Oxacilina	250	0,10	0,00		
	2.20	250	125,00	0,50	0,50	
	Amoxicilina	250	0,06	0,00		Sinergismo
	2.20	250	62,00	0,25	0,26	
	Oxacilina	250	3,50	0,01		Sinergismo
	2.24	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.24	2	1	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	250	250	1		
	2.25	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.25	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	250	250	1		
	2.26	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Amoxicilina	250	250	1		
	2.26	15	7,5	0,5	1,5	Indiferente
	Oxacilina	250	250	1		

Dos compostos derivados da dichamanetina, o composto **2.20** foi o mais ativo apresentando efeito sinérgico em todas as estirpes estudadas: MSSA ATCC 6538 (FICI = 0,07- oxacilina e 0,09-amoxacilina); MRSA ATCC 9144 (FICI=0,25 amoxacilina e oxacilina) e VISA ATCC 106414 (FICI = 0,26- oxacilina e 0,50 –amoxacilina). Já o composto **2.18** foi o que apresentou os melhores valores de FICI para as estirpes MSSA

ATCC 6538 (FICI = 0,04- oxacilina e 0,07-amoxacilina) e VISA ATCC 106414 (FICI = 0,15- oxacilina e 0,12-amoxacilina), sendo que não teve efeito modulador para a estirpe MRSA ATCC 9144.

Na Tabela 2.22 apresentam-se os valores de *Log P* calculados para os derivados da dichamanetina. Podemos verificar que o composto **2.18** apresenta uma maior lipofilia (*Log P* = 8,42) que o composto **2.20** (*Log P* = 7,88) o que leva a crer que esta característica contribui para o efeito sinérgico.

Tabela 2.22: Resultados obtidos do cálculo de *Log P* dos derivados de síntese da dichamanetina.

Compostos	Log P
Dichamanetina (2.2)	6,31
2.16	6,37
2.17	9,09
2.18	8,42
2.19	6,54
2.20	7,88
2.24	9,04
2.25	7,67
2.26	7,09

De um modo geral, e considerando que a dichamanetina não exibiu quaisquer efeitos sinérgicos, podemos afirmar que a lipofilia está ligada ao efeito sinérgico de alguns derivados. De facto, além de depender das características estruturais, a atividade moduladora também depende das características físico-químicas como o carácter lipofílico, um dos possíveis mecanismos de ação destes compostos poderá ser o aumento da permeabilidade das células bacterianas, principalmente pela perturbação da fração lipídica das membranas bacterianas (Abreu *et al.*, 2012).

2.3 Avaliação da atividade antifúngica

No sentido de caracterizar mais exaustivamente a atividade biológica do *C kirkii* e os seus componentes procedeu-se a determinação da capacidade destes componentes inibirem o desenvolvimento de um painel alargado de leveduras e fungos.

2.3.1 Determinação da concentração mínima inibitória fúngica

Neste capítulo apresentar-se-ão os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica dos compostos isolados (**2.1-2.13**) neste trabalho, assim como de compostos isolados anteriormente (**2.21** e **2.22**) (Pereira *et al.*, 2016) a partir do extrato metanólico

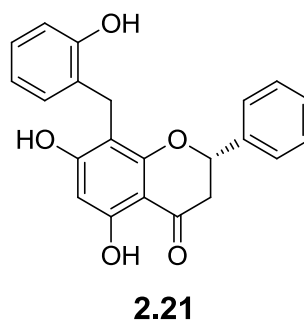
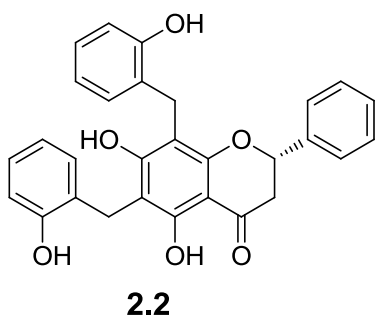
de *Cleistochlamys kirkii*. Nesse sentido, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) para cada composto utilizando um painel selecionado de estirpes de fungos (Tabela 2.21). O método utilizado para determinar a CMI, descrito na parte experimental, foi o de microdiluição que permitiu avaliar a atividade antifúngica, numa gama de concentrações entre 500-0,5 µg/mL.

As espécies utilizadas nestes ensaios foram escolhidas com base na sua relevância como agentes patogénicos como modelos na avaliação antifúngica. Assim utilizaram-se:

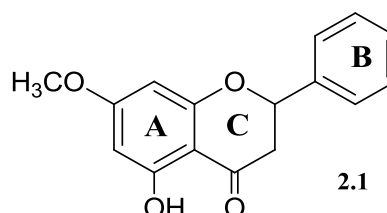
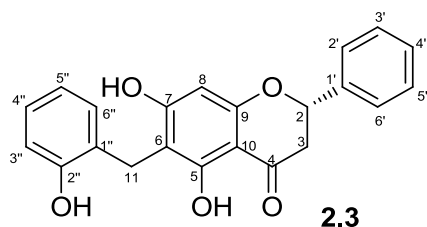
- Espécies de *Candida spp.* e o *Cryptococcus neoformans* que são os maiores responsáveis pelas infeções fúngicas tanto em comunidade como em ambiente hospitalar.
- O *Aspergillus niger* que é o fungo responsável pela produção de micotoxinas, que são hepatogénicas e nefrogénicas.
- A *Rhodotorula rubra* e o *Trichosporon cutaneum* que são agentes patogénicos oportunistas, particularmente relevantes em doentes imunossuprimidos, ou com cancro.
- O *Saccharomyces cerevisiae* que é o eucariota mais estudado e usado como espécie modelo (Baptista *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 2.23. Considera-se que os valores de CMI menores que 100 µg/mL são significativos, uma vez que estamos na presença de fungos (Cos P. *et al.*, 2006), enquanto para as bactérias considera-se um composto ativo com valores de CMI menores que 64 µg/mL (Gibbons S., 2006).

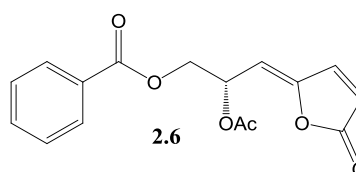
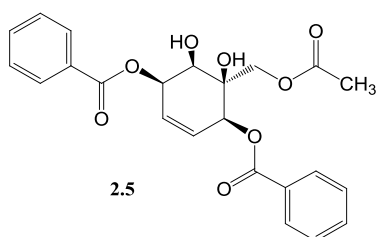
Da análise da Tabela 2.23, podemos verificar que todos os compostos apresentam atividade antifúngica numa ou mais espécies de fungos. Dos compostos isolados, a dichamanetina (**2.2**) e a chamanetina (**2.21**) exibiram uma maior atividade antifúngica com valores de CMI entre 4 e 62 µg/mL nas espécies, *C.albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *Aspergillus niger*, *S. cerevisiae* e *Rhodotorula rubra*.



A pinostrobin (**2.1**) apresentou atividade antifúngica apenas para as espécies *Rhodotorula rubra* e *Geotrichium* (CMI = 62 µg/mL). Já a isochamanetina (**2.3**) apresentou atividade, (CMI entre 15 e 62 µg/mL), nas espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parasilopsis*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *C. neoformans* e foi o único composto com atividade para a espécie *C. parasilopsis*.



O (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) apresentou atividade sobre a espécie *Rhodotorula rubra* (CMI de 31 µg/mL) e para as espécies *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*, e *Geotrichium* (CMI de 62 µg/mL). O crescimento do *Trichosporon cutaneum* foi moderadamente inibido pelos compostos **2.5** e **2.6** (CMI de 62 µg/mL).



A espécie *Rhodotorula rubra* foi a que apresentou um maior número de compostos com atividade antifúngica, mais especificamente nove compostos (pinostrobin **2.1**, dichamanetina **2.2**, isochamanetina **2.3**, ciclo-hexeno **2.5** e o (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol **2.6**, foram ativas com valores de (CMI de 31 e 62 µg/mL) . A *C. dubliniensis*,foi a segunda espécie mais sensível, (CMI entre 4- 62 µg/mL). Para o *C.*

neoformans, seis compostos apresentaram atividade (**2.2**, **.2.3**, **2.6**, **2.7**, **2.9/2.10**, **2.11** e **2.21**), com valores de CMI entre 15 e 62 µg/mL.

A *C. tropicalis* foi inibida por quatro compostos (**2.2**, **2.6**, **2.7**, **2.13** e **2.21**), com valores de CMI entre 31 e 62 µg/mL, enquanto que o crescimento fúngico da *C. albicans* foi inibida por dois compostos (dichamanetina e ischamanetina). O crescimento da *C. krusei* apenas foi inibido pelo (*R*)-(*E*)-Acetilmelodorinol **2.6**.

A partir destes resultados podemos afirmar que as espécies pertencentes à divisão basidiomicota (*C. albicans*, *Rhodotorula rubra*, *C. neoformans* e *Trichosporon cutaneum*) são mais sensíveis aos compostos testados do que as espécies incluídas na divisão ascomicota (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e *Geotrichium*). As diferenças que essas espécies apresentam na filogenia, na natureza dos fungos, na variação do metabolismo, na organização da parede celular e no dimorfismo são fatores que podem afetar a resistência de algumas espécies aos antifúngicos (Baptista, *et al.*, 2015).

Tabela 2.23: Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos isolados em algumas espécies de fungos.

Estirpes	Compostos (CMI µg/mL)										
	2.1	2.2	2.3	2.5	2.6	2.7	2.9/2.10	2.11	2.13	2.21	2.22
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	125	62	62	125	125	62	125	125	125	15	125
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	125	31	125	125	62	31	125	125	62	62	125
<i>Candida dublinensis</i> FFUL 21	125	4	15	62	62	125	62	125	62	4	125
<i>Candida glabrata</i> FFUL 12B	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	125	125	125	125	62	125	125	125	125	125	125
<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 90018	125	-	62	125	125	-	125	125	125	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FFUL 1997	125	62	15	125	62	8	62	125	125	125	62
<i>Rhodotorula rubra</i> FFUL 190	62	62	31	62	31	62.5	31	31	31	62	62
<i>Cryptococcus neoformans</i> FFUL 948	125	15	15		125	62.5	62	62	125	31	125
<i>Trichosporon cutaneum</i> FFUL 18H	125	125	125	62	62	125	125	125	62	125	125
<i>Geotrichum</i>	62	-	31	62	62	-	62	62	62	-	-

2.1- Pinostrobin, 2.2-Dichamanetina, 2.3-Isochamanetina, 2.5- Kirkiinol, 2.6-(R)-(E)- acetilmelodorinol, 2.7- Cleistonol, 2.9-Cicloart-25-eno-3β,24-diol, 2.10-24-metilenocicloartanol, 2.11-β-sitostenona, 2.13- Butirolactama, 2.21- Chamanetina, 2.22- Cleitenolido.

CAPÍTULO 3

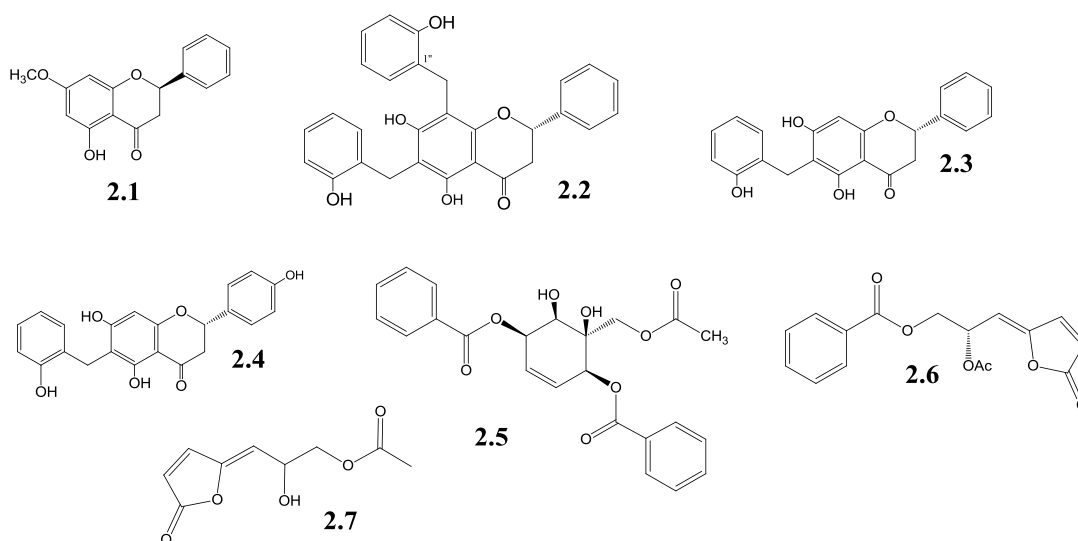
Conclusões

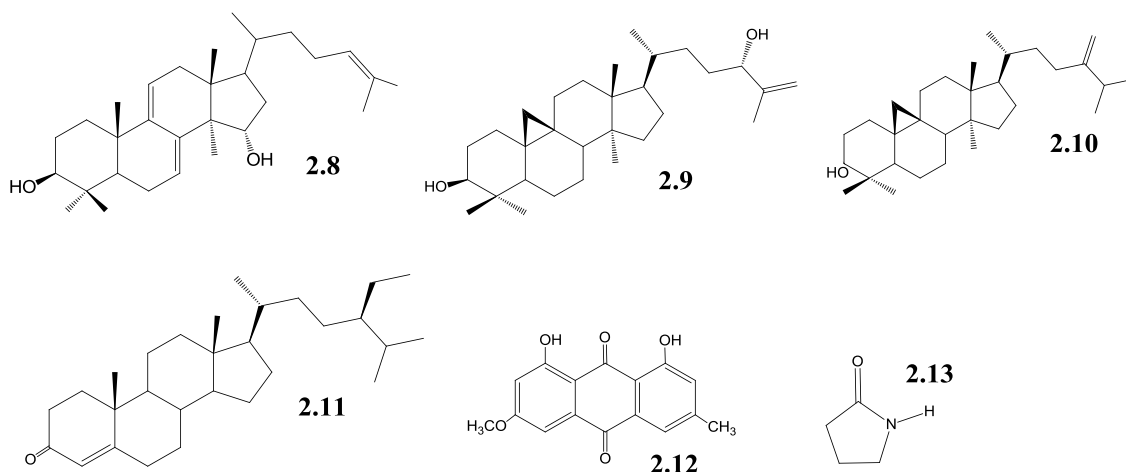
3. Conclusões

O objetivo principal desta dissertação foi a descoberta de moléculas com atividade antibacteriana e antifúngica a partir da planta medicinal Africana *Cleistochlamys kirkii*, usada na medicina tradicional de Moçambique no tratamento de doenças infecciosas.

Nesse sentido, recolheu-se a parte da planta usada pelas populações – casca da raiz – e procedeu-se ao estudo fitoquímico bioguiado do extrato metanólico. O fracionamento de três frações da parte solúvel em diclorometano do extrato de metanol, levou ao isolamento de treze compostos: um composto novo com um esqueleto pouco comum derivado do ciclo-hexeno, designado por kikiinol (**2.5**); uma flavona, a pinostrobin (**2.1**); três flavanonas C-benziladas, a dichamanetina (**2.2**), a isochamanetina (**2.3**) e a *epi*-feligrina-A (**2.4**); dois derivados do heptano, o (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) e um composto novo designado por cleistonol (**2.7**); três triterpenos, o poliocarpol (**2.8**), o cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (**2.9**) e o 24-metilenocicloartanol (**2.10**); um esteroide, a β -sitostenona (**2.11**); uma antraquinona, o physcion (**2.12**) e a butirolactama (**2.13**).

O fracionamento foi realizado recorrendo ao uso de várias técnicas cromatográficas, nomeadamente cromatografia em coluna e cromatografia preparativa. A identificação e caracterização das várias estruturas foram realizadas através de métodos espectroscópicos (IV, MS e espectroscopia de RMN a uma dimensão - ^1H RMN, ^{13}C RMN/DEPT, e bidimensional, COSY, NOESY, HMQC e HMBC).





A atividade antibacteriana dos compostos foi avaliada em estirpes Gram-positivas de *Staphylococcus aureus*, nomeadamente numa estirpe sensível (ATCC 6538), em estirpes resistentes à metilina (ATCC 43300 e ATCC 9144) e ainda na estirpe CIP 106414, metilina resistente com resistência intermédia à vancomicina, no *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e em duas estirpes de bactérias gram-negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

A dichamanetina (**2.2**) e a isochamanetina (**2.3**) foram bastante ativas em todas as estirpes Gram-positivas testadas, com valores de CMI que variam entre 1 e 15 µg/mL. O derivado do heptano (*R*)-(*E*)-acetilmelodorinol (**2.6**) também apresentou atividade antibacteriana relevante nas estirpes ensaiadas.

A atividade antifúngica foi avaliada em doze espécies de fungos: seis espécies de *Candidas* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* FFUL 21, *C. glabrata* FFUL 12B, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. kruzei* ATCC 6258 e *C. parapsilopsis* ATCC 90018); *Rhodotorula rubra* FFUL190; *Trichosporon cutaneum* FFUL 18H, *Saccharomyces cerevisiae* FFUL 1997, *Cryptococcus neoformans* FFUL 948 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. Os compostos isolados (**2.1-2.13**), apresentaram atividade antifúngica em uma ou mais espécies de fungos. A dichamanetina (**2.2**) e a chamanetina (**2.21**) foram os mais ativos com valores de CMI entre 4 e 62 µg.mL⁻¹ nas espécies, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Aspergillus niger*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* e *C. tropicalis*.

O efeito dos compostos sobre o valor das CMI de antibióticos, quando usados em combinação, foi avaliado pelo método do *checkerboard*. O policarpol (**2.8**) (CMI 125 µg/mL) apresentou efeito sinérgico na estirpe MRSA ATCC 9144. Quando combinado com a oxacilina, reduziu 83 vezes o valor da CMI (FICI = 0,11), enquanto com a amoxicilina reduziu 33 vezes o valor da CMI FICI = 0,18). Foi também obtido

efeito sinérgico quando se combinou este composto com os antibióticos β -lactâmicos referidos (FICI = 0.30) e com a vancomicina (FICI = 0.24) na estirpe VISA CIP 106760. O composto **2.8**, também exibiu sinergismo quando combinado com a dichamanetina (**2.2**). Observou-se também um efeito sinérgico com alguns derivados da dichamanetina (**2.16-2.20** e **2.24-2.26**), preparados anteriormente. Destes derivados, o composto **2.20** apresentou sinergismo em todas as estirpes e combinações ensaiadas. O composto **2.18** (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$) apresentou o melhor efeito sinérgico na estirpe VISA CIP 106414. Quando combinado com a oxacilina (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$), o composto **2.18** reduziu a CMI para 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.15), enquanto para a amoxicilina (MIC 250 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a CMI para 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (FICI = 0.12). Estes dois compostos (**2.18** e **2.20**) são muitos lipofílicos, o que nos leva a concluir que a lipofilia constitui um fator importante para o efeito modulador destes compostos.

Os resultados obtidos indicam que a espécie *C. kirkii* é constituída por estruturas de grande diversidade química, nomeadamente flavanonas C-benziladas raramente isoladas anteriormente, e com forte atividade antibacteriana em estirpes resistentes. Além disso, para a atividade antibacteriana da planta parecem contribuir não só compostos com atividade antibacteriana intrínseca mas também compostos como o policarpol (**2.8**), que exercem efeito sinérgico.

Este trabalho contribui para a validação de *C. kirkii* como planta medicinal para o tratamento de doenças infecciosas.

CAPÍTULO 4

Parte Experimental

4. Procedimento experimental

4.1. Instrumentação e técnicas gerais

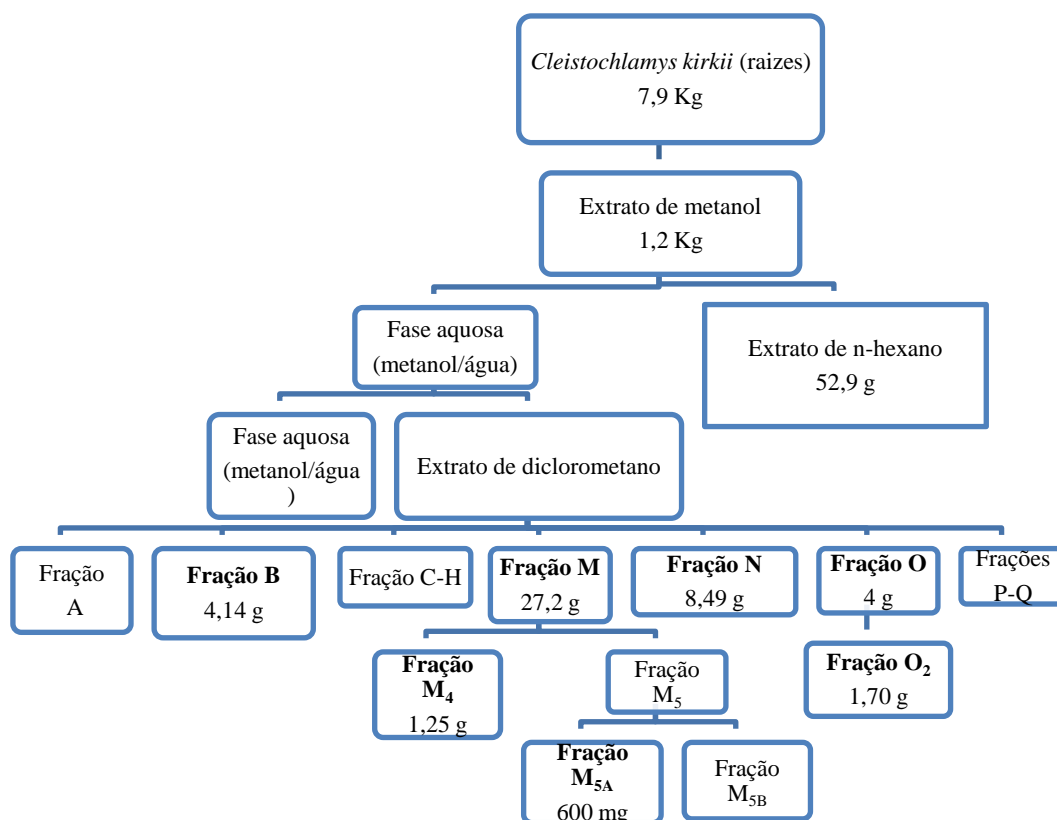
Os espectros de infravermelho IV foram traçados num espectrofotómetro Shimadzu IRAffinity-1, em pastilhas de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram traçados nos espectrofotómetros Bruker ARX-400 (^1H 400 MHz; ^{13}C 100,61 MHz) e Bruker ARX-300 (^1H 300 MHz; ^{13}C 75,45 MHz) utilizando-se como solventes CDCl_3 , MeOD e/ou acetona deuterados. Os desvios químicos dos espectros de ^1H e ^{13}C estão expressos em δ (ppm) e as constantes de acoplamento dos prótons (J) em Hertz (Hz). As rotações ópticas específicas foram medidas usando um polarímetro Perkin Elmer 241 com uma célula de quartzo de 1 dm de comprimento e as amostras preparadas em CHCl_3 . As rotações ópticas específicas foram medidas usando um polarímetro Perkin Elmer 241 com uma célula de quartzo de 1 dm de comprimento e as amostras preparadas em CHCl_3 . As análises de ESI-MS foram efectuadas num espectrómetro de massa (Micromass Quattro Micro AP1) de triplo quadropolo (QT) com fonte de ionização por electrospray (ESI), funcionando em modo positivo (Waters, Milford, USA). A cromatografia em coluna (CC) utilizou-se como adsorvente sílica-gel SiO_2 (Merck, ref. 9385) e um sistema automático combiflash, utilizando colunas de 12 ou 24 g. Na cromatografia de fase reversa foi realizada em coluna utilizando como adsorvente sílica gel RP18. Os eluídos foram controlados por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica de 0,2 mm de espessura (Merck, ref. 1.05554), com eluentes variados, dependendo das características das amostras aplicadas. Após o desenvolvimento, as placas foram pulverizadas com uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) e reveladas por ação do calor, tendo sido visualizadas sob luz UV (λ 254 e λ 366 nm) antes e depois da ação dos reagentes reveladores. Na cromatografia preparativa usaram-se placas de sílica 20 x 20 cm com 0,5 mm de espessura (Merck, ref. 1.05774), recorrendo a eluentes variados, dependendo das características da amostra aplicada.

Nos ensaios antibacterianos, a medição da densidade óptica das placas de microtitulação foi realizada num leitor de microplacas Biotek ELX 808 tendo sido registada a sua absorvância a λ 630 nm.

4.2. Estudo fitoquímico da *Cleistochlamys kirkii*

Neste capítulo é descrito o estudo fitoquímico de algumas frações do extrato de diclorometano da espécie *Cleistochlamys kirkii* efetuado anteriormente no grupo de investigação em que este trabalho se insere (Pereira, *et al.*, 2016). O fracionamento e purificação das referidas frações levaram ao isolamento de treze compostos (2.1-2.13).

As raízes da espécie *Cleistochlamys kirkii* (7,9 Kg) foram secas, moídas e extraídas até à exaustão com metanol à temperatura ambiente. O resíduo do extrato obtido (1,2 Kg) foi suspenso numa mistura de MeOH/H₂O (9:1) e extraído sequencialmente com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etilo. A fração de diclorometano (215,4 g) foi cromatografada numa coluna de sílica gel, onde se usaram como eluentes misturas de *n*-hexano/AcOEt e AcOEt/MeOH de polaridade crescente. Neste trabalho foram selecionadas a fração B (4,14 g), fração M₄ (1,25 g), fração M_{5A} (600 mg), fração N (8,49 g) e fração O₂ (1,7 g) para estudo fitoquímico.



Esquema 4.1: Metodologia da extração de *Cleistochlamis kirkii* (Pereira, *et al.*, 2016).

4.2.1. Estudo da fração B do extrato de diclorometano

A fração B foi cromatografada numa coluna de sílica gel (400 g) que foi eluída com um gradiente de *n*-hexano/CH₂Cl₂ (100:0, 0,5 L; 95:5, 0,5 L; 90:10, 0,5 L; 85:15, 0,4 L; 80:20, 0,4; 75:25, 0,4 L; 70:30, 0,4 L; 65:35, 0,4 L; 60:40, 0,4; 55:45, 0,4 L; 50:50, 4 L; 45: 55, 0,4 L ;40:60, 0,4 L; 35:65, 0,4L; 30:70, 0,4 L; 25:75, 0,4 L; 20:80, 0,5 L; 15:85, 0,4 L 0:100, 0,5 L) e CH₂Cl₂/MeOH (90:10, 0,5 L; 30:70, 1 L). Após a análise cromatográfica por cromatografia em camada fina (c.c.f), os eluídos obtidos foram associados em várias frações de acordo com o seu perfil cromatográfico, conforme indicado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Frações da cromatografia em coluna da fração B do extrato de diclorometano.

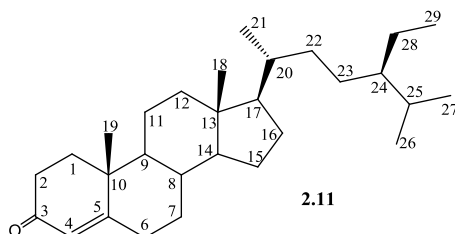
Frações	Massa (g)	Eluente	Relação v/v
B ₁	0,027	<i>n</i> -hexano/CH ₂ Cl ₂	45:55
B ₂	0,541	<i>n</i> -hexano/CH ₂ Cl ₂	35:65
B ₃	0,27	<i>n</i> -hexano/CH ₂ Cl ₂	30:70
B ₄	1,65	<i>n</i> -hexano/CH ₂ Cl ₂	20:80
B ₅	0,36	<i>n</i> -hexano/CH ₂ Cl ₂	10:90
B ₆	0,18	CH ₂ Cl ₂ /MeoH	100:5

4.2.1.1. Estudo da fração B₅

A fração **B₅** (0,36 g, Esquema 4.2) foi cromatografada em coluna sílica-gel utilizando 200 g de sílica e como eluentes misturas de *n*-hexano/CH₂Cl₂ de polaridade crescente (100:0, 200 mL; 90:10, 200 mL, 1 L; 80:20, 200mL; 70:30, 200 mL; 60:40, 200 mL; 50:50, 1 L; 0:100, 500 mL) e CH₂Cl₂/ MeOH (100: 30 400 mL).

As frações resultantes foram agrupadas após caracterização em cromatografia em camada fina. A fração principal **B_{5C}** [(249 mg), eluída com *n*-hexano/CH₂Cl₂ (50:50)], apresentou uma mistura de dois compostos maioritários. Para proceder à separação dos compostos, a fração **B_{5C}** foi cromatografada em coluna utilizando 15 g de sílica e misturas de *n*-hexano/EtOAc de polaridade crescente (100: 0 100 mL; 99,5:0,5, 100 mL; 99:1, 100 mL; 98,5: 1,5 100 mL; 98:2, 100 mL; 97,5:2,5, 100 mL; 97:3, 100

mL; 96,5:3,5, 100 mL; 96:4, 500 mL). As frações recolhidas foram associadas de acordo com o seu perfil cromatográfico, obtendo-se um composto puro (65 mg). A respetiva análise espectroscópica permitiu identificar a **β -sitostenona (2.11)**.



β -sitostenona (2.11)

Sólido amorfo branco.

Rf: 0,33 *n*-hexano CH₂Cl₂ (30:70).

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (KBr): 1677, 1617, 1412, 1377, 1029, 959, 933, 865.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 5,72 (1H, *s* (largo), H-4), 2,43 (1H, *d*, *J* = 4,9 Hz H-2 β), 2,37 (1 H, *d*, *J* = 4,9 Hz H-2 α), 0,92 (3 H, *d*, *J* = 6,3 Hz, H-21), 1,17 (3 H, *s*, H-19), 0,86 (3 H, *t*, *J* = 7,4 Hz, H-29), 0,84 (3 H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-26), 0,81 (3 H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-27), 0,71 (3 H, *s*, H-18).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 199,8 (C-3), 138,8 (C-5), 123,8 (C-4), 56,1 (C-17), 56,0 (C-14), 53,9 (C-9), 45,9 (C-24), 42,5 (C-13), 39,7 (C-12), 38,7 (C-10), 36,2 (C-20), 35,8 (C-1), 32,1 (C-7, C-8), 34,1 (C-2), 34,0 (C-22), 33,0 (C-6), 29,2 (C-25), 28,3 (C-16), 26,2 (C-23), 24,3 (C-15), 23,1 (C-28), 21,1 (C-11), 19,1 (C-27), 19,9 (C-26), 18,5 (C-21), 17,5 (C-19), 12,09 (C-29).

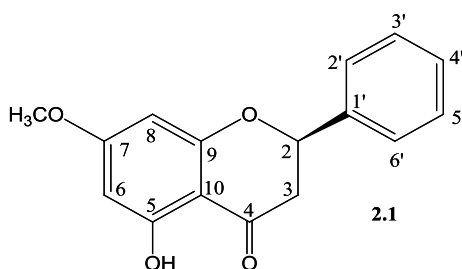
4.2.1.1.2. Estudo da fração B₂

A fração **B₂** (0,541 g; cf. Tabela 4.1) foi cromatografada em coluna com 100 g de sílica e com misturas de *n*-hexano/CH₂Cl₂ de polaridade crescente (100:0 a 100:0, gradiente de 10%; porções de 200 mL) e CH₂Cl₂ / MeOH (70:30, 40 mL). Após análise por cromatografia em camada fina (c.c.f), as frações recolhidas foram associadas, em duas frações principais **B_{2A}** e **B_{2B}** (**0,422 g**). A fração **B_{2B}** [eluída com *n*-hexano/CH₂Cl₂ (50:50)], constituída por uma mistura de compostos, foi cromatografada em coluna com 25 g de sílica-gel RP18 de fase reversa, com misturas de H₂O/MeOH de polaridade decrescente (70:30 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 400 mL). Após a análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas conforme descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Frações obtidas da cromatografia da fração **B_{2B}** resultante da fração **B₂**.

Frações	Massa (g)	Eluente	Relação v/v
B_{2B1}	0,070	H ₂ O/MeOH	20:80
B_{2B2}	0,187	H ₂ O/MeOH	20:80
B_{2B3}	0,060	H ₂ O/MeOH	10:90

Verificou-se que a fração **B_{2B1}** (70 mg, cf. Tabela 4.2) se encontrava pura, pelo que se procedeu-se à respetiva análise espectroscópica tendo-se verificado estar na presença da **pinostrobina (2.1)**.



Pinostrobina (2.1)

Sólido amorfo branco.

Rf: 0,33 *n*-hexano/CH₂Cl₂ (50:50).

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3431, 1653, 1341, 1292, 1202, 1157, 769, 701.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12,05 (1H, *s*, 5-OH), 7,45 (5H, *m*, H-2'-6'), 6,08 (1H, *s largo*, H-6.), 6,07 (1H, *s largo*, H-8), 5,43 (1H, *dd*, $J = 13,0, 2,8$ Hz, H-2), 3,84 (3H, *s*, 7-OCH₃), 3,12 (1H, *dd*, $J = 17,2; 13,0$ Hz, H-3b), 2,83 (1H, *dd*, $J = 17,2; 3,0$ Hz, H-3a).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 195,9 (C-4), 168,1 (C-7), 164,2 (C-9), 162,9 (C-5), 138,4 (C-1''), 129,0 (C-3', C-5'), 126,2 (C-2', C-6'), 103,2 (C-10), 95,2 (C-6), 94,4 (C-8), 79,3 (C-2), 55,8 (OCH₃), 43,5 (C-3).

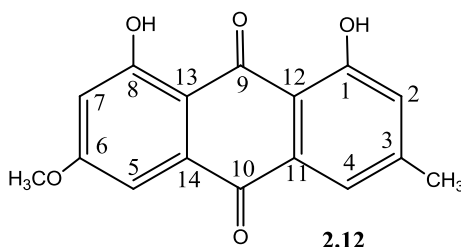
4.2.1.2.1. Estudo da fração B_{2B2}

A fração **B_{2B2}** (187 mg, cf. Tabela 4.2) cristalizou do solvente de eluição sob a forma de cristais amarelos que por c.c.f mostraram ser constituídos por um composto

maioritário com absorção a 254 nm e algumas impurezas. Efetuou-se uma recristalização por gradiente térmico, utilizando como solvente uma mistura de *n*-hexano/AcOEt, que permitiu obter 100 mg de cristais puros que após análise espectroscópica foram identificados como sendo a **pinostrobin** (2.1).

4.2.1.2.2. Estudo da fração B_{2B3}

A fração **B_{2B3}** (60 mg, cf. Tabela 4.2), eluída com *n*-hexano/CH₂Cl₂ (30:70), apresentava ser uma mistura de dois compostos. Para os separar procedeu-se a uma cromatografia preparativa eluída três vezes *n*-hexano/CH₂Cl₂, 50:50. Após a eluição, foi recolhida a banda correspondente ao composto maioritário (18 mg). A análise espectroscópica permitiu identificar um composto denominado de **physcion** (2.12).



Physcion (2.12)

Sólido amorfo vermelho.

Rf: 0,53 *n*-hexano/CH₂Cl₂ (50:50).

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (KBr): 3447, 1628, 1614, 1298, 1226, 1036, 757.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12,32 (1H, *s*, 8-OH), 12,22 (1H, *s*, 1-OH), 7,63 (1H, *d*, *J* = 0,8 Hz, H- 4), 7,37 (1H, *d*, *J* = 2,6 Hz, H-5), 7,08 (1H, *d*, *J* = 0,8 Hz, H-2), 6,69 (1H, *d*, *J* = 2,6 Hz, H-7), 3,94 (3H, *s*, 6-OCH₃), 2,45 (3H, *s*, 3-CH₃),

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 190,9 (C-9), 182,1 (C-10), 166,6 (C-6), 165,3 (C-8), 162,6 (C-1), 148,5 (C-3), 135,3 (C-14), 133,3 (C-11), 124,6 (C-2), 121,4 (C-4), 113,7 (C-12), 110,3 (C-13), 108,3 (C-5), 106,9 (C-7), 56,2 (6-OCH₃), 22,3 (3-CH₃).

4.2.1.2. Estudo da fração B₃

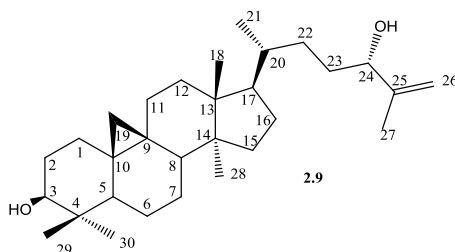
A fração **B₃** (0,27 g; cf. Tabela 4.1) foi cromatografada em coluna utilizando 150 g de sílica e misturas de *n*-hexano/CH₂Cl₂ (100:0 a 50:50, gradiente de 5%; 40:60 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 200 mL) e CH₂Cl₂/ MeOH (70:30, 400 mL) Após análise por c.c.f, as frações semelhantes recolhidas foram associadas e destas destacou-

se a fração **B_{3D}** (30 mg) eluída com *n*-hexano/CH₂Cl₂ (30:70), que apresentava uma mistura de três compostos, sendo um maioritário. Aplicou-se a mistura numa placa preparativa que foi eluída duas vezes com uma mistura *n*-hexano/ CH₂Cl₂ (30:70). Após eluição, foi recolhida a banda correspondente ao composto maioritário (10 mg) que por análise espectroscópica foi identificado como sendo a **pinostrobin** (**2.1**).

4.2.1.4. Estudo da fração **B₄**

A fração **B₄** (1,65 g; cf. Esquema 4.2) foi submetida a uma cromatografia em coluna com 90 g de sílica, eluída com misturas de *n*-hexano/CH₂Cl₂ de polaridade crescente (100:0 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 400 mL) e CH₂Cl₂/MeOH (100: 30, 800 mL).

Após análise cromatográfica por c.c.f, as frações semelhantes foram associadas, obtendo-se uma fração principal **B_{4A}** [(**0,193 g**), (*n*-hexano/CH₂Cl₂ , 30:70), constituída por um composto maioritário. A amostra foi aplicada numa placa preparativa que foi eluída duas vezes com *n*-hexano/ CH₂Cl₂ (50:50). Após eluição, foi recolhida a banda correspondente ao composto maioritário (80 mg). A análise espectroscópica do composto obtido permitiu identificar uma mistura de dois derivados do cicloartenol, o **cicloart-25-eno-3β,24-diol** (**2.9**) e o **24-metilenocicloartanol** (**2.10**).



Cicloart-25-eno-3β,24-diol (2.9)

Sólido amorfo branco

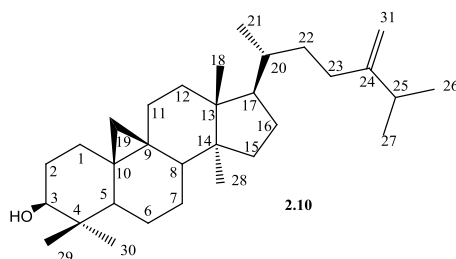
Rf: 0,26 *n*-hexano/CH₂Cl₂

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3460, 1618, 1414, 1384.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,90 (1 H, *s largo*, H-26a), 4,87 (1H, *s largo*, H-26b), 3,64 (1H, *t*, *J* = 6,4 Hz, H-24) 3,25 (1H, *dd*, *J* = 11,0; 4,5 Hz, H-3), 1,75 (3H, *s*, H-27), 0,97 (3H, *s*, H-18), 0,96 (3H, *s*, H-29), 0,88 (3 H, *s*, H-28), 0,87(3H, *d*, *J* = 5,4 Hz, H-21), H-28), 0,81 (3H,*s*, H-30), 0,56 (1H, *d*, *J* = 3,9 Hz), 0,33 (1H, *d*, *J* = 4,5 Hz, H-19).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 147,3 (C-25), 110,9 (C-26), 79,1 (C-3), 72,2 (C-24) 50,5 (C-17), 48,6 (C-5, C-14), 45,3 (C-13), 35,8 (C-20), 35,4 (C-12), 30,9 (C-22), 29,8

(C-19), 29,4 (C-23), 26,6 (C-2, C-16), 25,8 (C-10, C-11), 25,0 (C-19), 21,1 (C-6), 19,2 (C-28), 18,5 (C-21), 18,4 (C-27), 15,5 (C-30).



24-metilenocicloartanol (2.10)

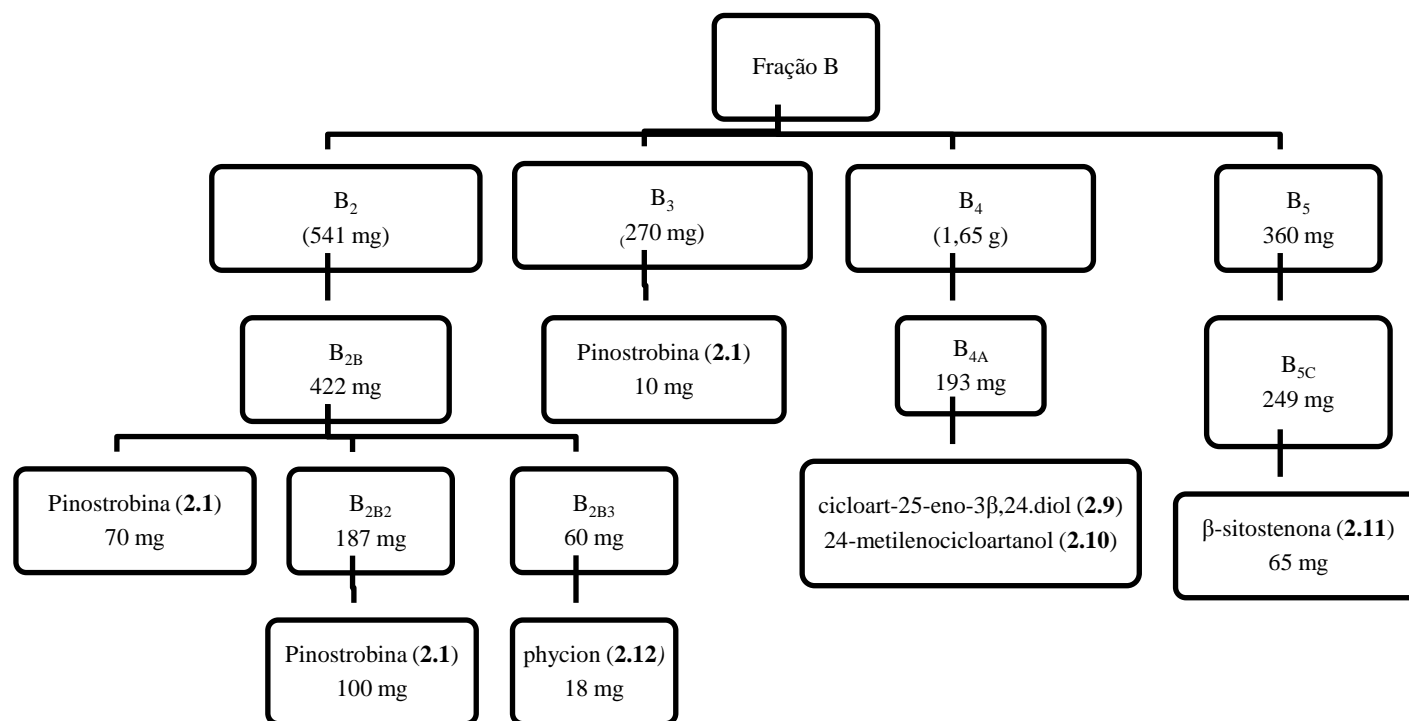
Sólido amorfo branco

Rf: 0,26 *n*-hexano/CH₂Cl₂

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (KBr): 3460, 2956, 1618, 1414, 1384.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,71 (1 H, *s largo*, H-31 β), 4,66 (1H, *s largo*, H-31 α), 3,25 (1H, *dd*, *J*=11,0; 4,5 Hz, H-3), 1,03 (3 H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-26), 1,02 (3H, *d*, *J* = 6,8 Hz, H-27), 0,97 (3H,*d*, *J* = 6,7 Hz, H-29, H-18), 0,89 (3H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-21), 0,88 (3H, *s*, H-28), 0,81 (3H, *s*, H-30), 0,56 (1H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-19a), 0,33 (1H, *d*, *J* = 3,9 Hz, H-19b).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 147,3 (C-25), 110,9 (C-26), 106,4 (C-31), 79,1 (C-3), 72,2 (C-24) 50,5 (C-17), 48,6 (C-5, C-14), 45,3 (C-13), 35,8 (C-20), 35,4 (C-12), 30,9 (C-22), 29,8 (C-19), 29,4 (C-23), 26,6 (C-2, C-16), 25,8 (C-10, C-11), 25,0 (C-19), 21,1 (C-6), 19,2 (C-28), 18,5 (C-21), 18,4 (C-27), 15,5 (C-30).



Esquema 4.2: Estudo da fração B; obtenção dos compostos **2.1**, **2.9**, **2.10**, **2.11** e **2.12**.

4.2.2. Estudo da fração M

A fração M foi anteriormente cromatografada e fracionada pelo grupo de investigação que o trabalho se insere, Esquema 4.1 (Monteiro, 2014). Neste trabalho foram estudadas as frações M₄ e M_{5A} e M₅.

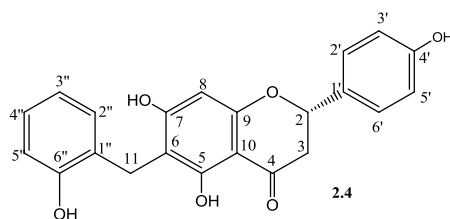
4.2.2.1. Estudo da fração M_{5A}

A fração M_{5A} (600 mg) foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna de 50 g de sílica-gel C-18 de fase reversa. A eluição fez-se com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10 mL/min, λ 254 e 215 nm). Após a análise cromatográfica por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas conforme descrito na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Cromatografia da fração M_{5A}.

Frações	Eluente	Relação v/v	Massa (mg)
M _{5A1}	H ₂ O/MeOH	20:80	53
M _{5A2}	H ₂ O/MeOH	20:80	15
M _{5A3}	H ₂ O/MeOH	20:80	3
M _{5A4}	H ₂ O/MeOH	15:85	240
M _{5A5}	H ₂ O/MeOH	10:90	90

Uma vez que a fração M_{5A1} (53 mg no total; cf. Tabela 4.3) apresentava no seu perfil cromatográfico três manchas, foi aplicada numa placa preparativa e eluída duas vezes com uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Após a eluição, foram separadas três bandas, duas delas correspondentes a produtos puros que foram caracterizados espectroscopicamente. O produto da banda de menor R_f (3 mg) foi identificado como sendo a ***epi-feligrina A* (2.4)**, enquanto que o outro (33 mg) foi caracterizado como sendo o ***kirkiinol* (2.5)**.



Epi-feligrina A (2.4)

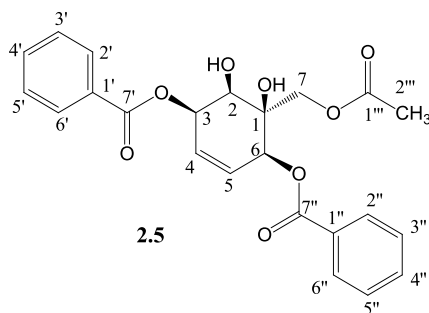
Sólido amorfo branco amorfo

Rf: 0, 16 CH₂Cl₂/MeOH (98:2)

IV $\nu_{\text{máx}}$ **cm⁻¹** (KBr): 3432, 1633, 1488, 1384, 1217, 798.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 7,28 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz H-2', H-6'), 6,94 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, H-2'', H-5''), 6,77 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3', H-5'), 6,71 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, H-4''), 6,64 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, H-3''), 5,95 (1H, *s*, H-8), 5,30 (1H, *dd*, *J* = 13,2; 2,7 Hz, H-2), 3,77 (2H, *s*, H-11), 3,09 (1H, *dd*, *J* = 17,0; 13,2 Hz, H-3 β), 2,65 (1H, *dd*, *J* = 17,2; 2,7 Hz, H-3 α).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 198,0 (C-4), 166,1 (C-5, C-9), 161,8 (C-9), 159,0 (C-4'), 155,5 (C-6''), 131,1 (C-1'), 130,6 (C-2''), 129,0 (C-2', C-6'), 128,1 (C-1''), 127,8 (C5''), 120,7 (C-3''), 116,2 (C-3', C-5'), 115,8 (C-4''), 108,5 (C-6), 95,8 (C-8), 80,5 (C-2), 44,1 (C-2), 22,4 (C-11).



Kirkiinol (2.5)

Rf: 0,22 CH₂Cl₂/MeOH (98:2)

[α]_D²² = - 122,6 (CHCl₃, c 0,001)

ESI-MS: *m/z* 446 [M + Na]⁺, 305.

IV $\nu_{\text{máx}}$ **cm⁻¹** (KBr): 3463, 1715, 1653, 1265, 1095, 709.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,05 (4H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, H-2' e H-6', H- 2'', H-6''), 7,60 (2H, *t*, *J* = 7,3 Hz, H-4', H-4''), 7,47 (4H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-3', H-5', H-3'', H-5''), 6,05 (1H, *dd*, *J* = 10,1; 3,6 Hz, H-5), 5,99 (1H, *dd*, *J* = 10,1; 2,2 Hz, H-4), 5,77 (1H, *d*, *J*

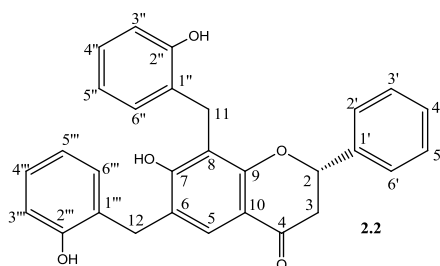
= 6,1; 2,2 Hz H-3), 5,68 (1H, *d*, *J* = 3,6 Hz, H-6), 4,62 (1H, *d*, *J* = 12,2 Hz, H-7b), 4,41 (1H, *d*, *J* = 12,2 Hz, H-7a) 4,25 (1H, *d*, *J* = 6,1 Hz H-2), 3,58 (1H, *s*, 1-OH), 3,37 (1H, *s*, 2-OH), 1,88 (3H, *s*, H-2''').

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171,8 (C-1'''), 167,1 (C-1'), 165,8 (C-1''), 133,7 (C-5', C-5''), 133,6 (C-2') 130,01 (C-3', C-7''), 129,8 (C-3', C-7'), 129,5 (C-2''), 128,7 (C-4, C-4', C-6'), 128,6 (C-4'' e C-6''), 126,7 (C-5), 74,8 (C-1), 73,5 (C-3), 71,7 (C-2), 71,1 (C-1), 66,5 (C-7), 20,7 (C-2''').

4.2.3. Estudo da fração M₄

A fração **M₄** (**1,25 g**, cf Esquema 4.3) foi cromatografada em coluna com 130 g de sílica e eluída com misturas de *n*-hexano/EtOAc de polaridade crescente (100:0 a 60:40, gradiente 10%; porções de 400 mL; 55:45, gradiente 5% ; porções de 600 mL; 30:70 a 0:100, gradiente de 10%, porções de 600 mL) e EtOAc/MeOH (100: 30 800 mL).

Após análise cromatográfica por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas, obtendo-se uma fração principal **M_{4A}** **0,593 g**, (*n*-hexano/CH₂Cl₂ 30:70). A fração foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna com 43 g de sílica-gel C-18 de fase reversa, eluída com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10 mL/min, λ 254 e 215 nm). Após a análise em TLC, as frações recolhidas foram associadas, obtendo-se uma fração maioritária principal **M_{4A1}** (**0,253 g**), (*n*-hexano/CH₂Cl₂ (30:70). Esta foi recromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna com 43 g C-18 de fase reversa, eluída com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10 mL/min a λ 254 e 215 nm). Após a análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas, obtendo-se uma fração **M_{4A1A}** (**82 mg**) (CH₂Cl₂/MeOH 98:2), composta por duas manchas. A amostra foi aplicada numa placa preparativa e foi eluída duas vezes com CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Após a eluição, foi recolhida a banda correspondente ao composto maioritário (28 mg) e da análise espectroscópica foi identificada a **dichamanetina (2.2)**.



Dichamanetina (2.2)

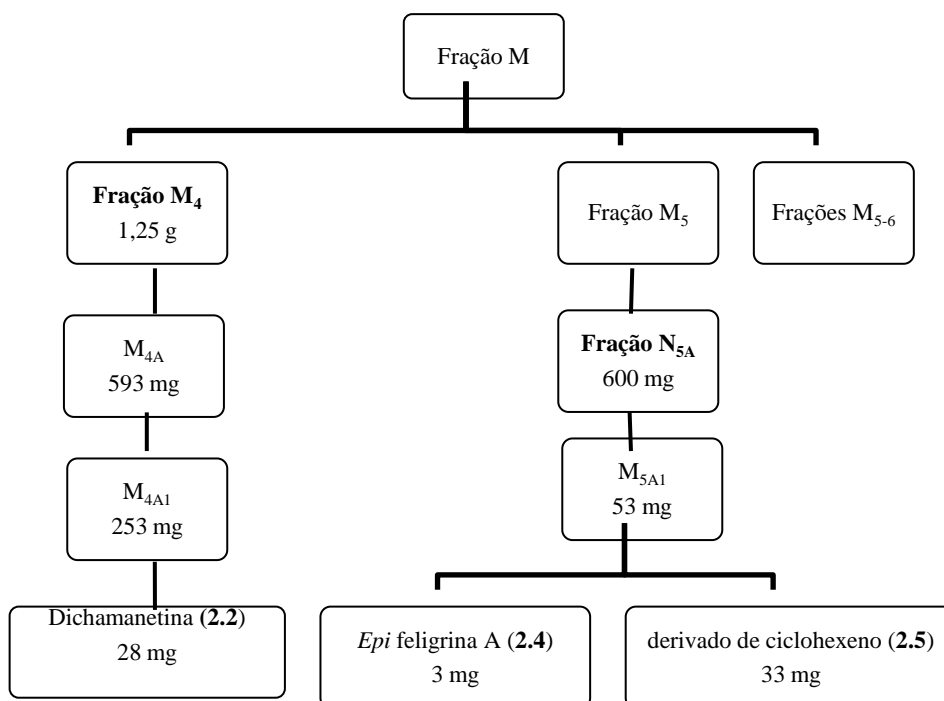
Sólido amorfo de cor laranja tênue.

Rf: 0,58 CH₂Cl₂/MeOH (98:2)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (KBr): 3235, 1632, 1603.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7,64 (2H, *d*, *J* = 7,4 Hz, H- 2', H-6'), 7,59 (2H, *t*, *J* = 7,4 Hz, H-3', H-5'), 7,52 (2H, *t*, *J* = 7,4 Hz, H-4', 6'''), 7,27 (1H, *d*, *J* = 7,4 Hz, H-6''), 7,14 (2H, *t*, *J* = 6,4 Hz, H-4'', H-4'''), 6,90 (3H, *m*, H-3'', H-3''', H-5'''), 6,81 (1H, *t*, *J* = 7,4 Hz, H-5''), 5,54 (1H, *dd*, *J* = 13,0; 2,4 Hz, H-2), 4,01 (2 H, *s*, H-12), 3,98 (2H, *s*, H-11), 3,17 (1H, *dd*, *J* = 17,0; 13,0 Hz, H-3b), 2,54 (1H, *dd*, *J* = 17,1; 2,9 Hz, H-3a).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 196,6 (C-4), 167,0 (C-7), 160,3 (C-5), 159,2 (C-9), 154,7 (C-2'', C-6'''), 140 (C-1'), 131,5 (C-6'''), 131,4 (C-6''), 129,2 (C-3', C-6'), 129,1 (C-4'), 128,1 (C-1''), 128 (C-1'''), 127,6 (C-4'', C-4'''), 126,7 (C-2', C-6'), 120,5 (C-3'''), 120,3 (C-5''), 116,0 (C-5'''), 115,9 (C-3''), 109,5 (C-6), 108,8 (C-8), 103,3 (C-10), 79,6 (C-2), 43,8 (C-3), 24,1 (C-12), 23,4 (C-11).



Esquema 4.3: Estudo da fração M, obtenção dos compostos 2.2, 2.4 e 2.5.

4.2.4. Estudo da Fração O

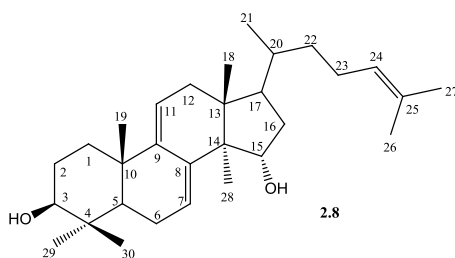
A fração **O** precipitou durante o processo cromatográfico (*n*-hexano/ AcOEt, 60:40 a 40:60). O precipitado (4 g), que apresentava uma mancha maioritária, foi recromatografado obtendo-se duas frações principais: **O₁** (254 mg), constituído por composto puro que foi identificado como sendo o **policarpol (2.8)**, e a fração **O₂** (**1,70 g**) (Pereira, *et al.*, 2016).

A fração **O₂** (1,70 g) foi cromatografada numa coluna com 90 g de sílica e usando como eluentes misturas de *n*-hexano/EtOAc de polaridade crescente (100:0 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 400- 600 mL mL) e EtOAc/ MeOH (100: 30, 800 mL). Após análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas de acordo com seu perfil cromatográfico, conforme descrito na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Cromatografia da fração **O₂**.

Frações	eluente	Relação v/v	Massa (mg)
O_{2A}	<i>n</i> -hex/EtOAc	20:80	13
O_{2B}	<i>n</i> -hex/EtOAc	20:80	263
O_{2C}	<i>n</i> -hex/EtOAc	20:80	153
O_{2D}	<i>n</i> -hex/EtOAc	20:80	303
O_{2E}	H ₂ O/MeOH	50:50	394

Das frações associadas, verificou-se que a fração **O_{2B}** (**263 mg**), eluída com *n*-hexano/EtOAc (20:80)], se encontrava pura. A análise espectroscópica do composto permitiu identificar o **policarpol (2.8)**.



Policarpol (2.8)

Sólido branco amorfo

Rf: 0,36 *n*-hexano/ EtOAc (80:20)

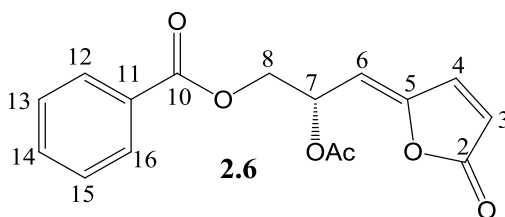
IV ν_{\max} cm^{-1} (KBr): 3356, 1637, 1443, 1375, 1036, 989.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5,85 (1H, *d*, $J = 6,2$ Hz, H-7), 5,31 (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz, H-11), 5,09 (1H, *t*, $J = 7,1$ Hz, H-24), 4,26 (1H, *dd*, $J = 10,0$; 4,9 Hz, H-15), 3,25 (1H, *m*, H-3), 2,29 (1H, *d*, $J = 17,9$ Hz, H-12 α), 2,12 (2H, *m*, H-6) 2,03 (2H, *m*, H-12), 1,96 (1H, *m*, H-16a), 1,75 (1H, *dd*, $J = 10,1$; 5,9 Hz, H-16 β), 1,68 (3H, *s*, H-26), 1,60 (3H, *s*, H-27), 1,35 (1H, *m*, H-20), 1,07 (1H, *d*, $J = 4,4$ Hz, H-5), 1,03 (1H, *m*, H-1), 1,00 (3H, *s*, H-29), 0,98 (3H, *s*, H-19), 0,94 (3H, *s*, H-28), 0,88 (6H, *s*, H-21, H-30), 0,61 (3H, *s*, H-18).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 146,2 (C-9), 141 (C-8), 131,3 (C-25), 125,0 (C-24), 121,4 (C-7), 116,2 (C-11), 79,5 (C-3), 74,9 (C-15), 52,4 (C-14), 49,1 (C-5), 49,0 (C-17), 44,4 (C-13), 40,2 (C-16), 39,8 (C-12), 37,5 (C-10), 36,3 (C-22), 35,8 (C-1, C-20), 28,9 (C-2), 28,2 (C-28), 25,8 (C-27), 23,5 (C-23), 23,0 (C-19), 18,5 (C-21), 17,8 (C-26), 17,2 (C-30), 16,2 (C-18), 15,9 (C-29).

4.2.2.3. Estudo da fração **O_{2D}**

A fração **O_{2D}** (303 mg) foi cromatografada em coluna com 20 g de sílica usando como eluentes misturas de *n*-hexano/ CH_2Cl_2 de polaridade crescente (100:0 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 200 mL) e CH_2Cl_2 / MeOH (100: 30, 400 mL). Após análise em c.c.f, as frações recolhidas foram associadas, conforme o seu perfil cromatográfico, obtendo-se duas frações **O_{2DA}** (54 mg) e **O_{2DB}** (119 mg) que se encontravam puras. Após análise espectroscópica foram identificadas o sendo a **isochamanetina (2.3)** e o **(R)- (E)-acetilmelodorinol (2.6)** respetivamente.



(R) - (E)-acetilmelodorinol (2.6)

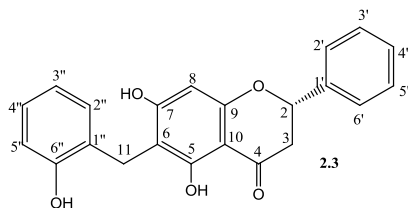
Sólido amorfo verde.

Rf: 0, 22 CH_2Cl_2 (100).

IV ν_{\max} cm^{-1} (KBr): 1784, 1749, 1722, 1375, 1225, 1105.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,00 (2H, *dd*, $J = 8,5$; 1,7 Hz, H-12 e H-16), 7,90 (1H, *d*, $J = 5,6$, Hz, H-3), 7,60 (1H, *m*, H-14), 7,46 (1H, *m*, H-13, H-15), 6,34 (1H, *dd*, $J = 5,6$ Hz, H-4), 5,98 (1H, *m*, H-7), 5,72 (1H, *m*, H-6), 4,50 (1H, *dd*, $J = 11,8$; 5,5 Hz, H-8a), 4,46 (1H, *dd*, $J = 11,8$; 5,5 Hz, H-8b), 2,09 (3H, *s*, 7-OCOCH₃),

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170,2 (7-OCOCH₃), 168,8 (C-2), 166,1 (C-10), 153,6 (C-5), 140,3 (C-3), 133,6 (C-14), 129,8 (C-12 e C-16), 129,4 (C-11), 128,6 (C-13 e C-15), 122,6 (C-4), 107,6 (C-6), 66,8 (C-7), 65,17 (C-8), 21,17 (7-OCOCH₃).



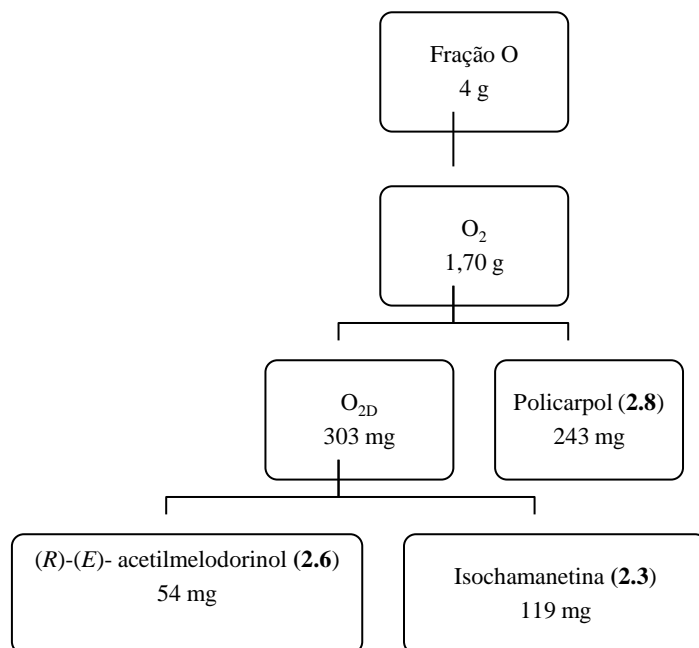
Isochamanetina (2.3)

Rf: 0,2 CH_2Cl_2 (100)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3432, 1653, 1292, 798.

^1H NMR (300 MHz, MeOD) 7,46 (2H, *dd*, $J = 8,0$; 1,4 Hz H-2' ,6'), 7,39 (2H, *m*, H-3' , H-5'), 7,34 (2H, *m*, H-4'), 6,98 (1H, *m*, H-2''), 6,93 (1H, *dd*, $J = 7,5$; 1,7 Hz, H-5''), 6,73 (1H, *dd*, $J = 8,0$; 1,1 Hz, H-4''), 6,66 (1H, *td*, $J = 7,4$; 1,2 Hz, H-3''), 6,00 (1H, *s*, H-8), 5,41 (1H, *dd*, $J = 12,9$; 3,0 Hz, H-2), 3,80 (2H, *s*, H-11) 3,07 (1H, *dd*, $J = 17,1$; 12,9 Hz, H-3 β), 2,73 (1H, *dd*, $J = 17,1$; 3,1 , Hz, H-3 α).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 197,5 (C-4), 165, 9 (C-5, C-9), 162,7 (C-7), 155,5 (C-6''), 140,4 (C-1'), 130,6 (C-2''), 129,7 (C-3', C-5'), 129,6 (C-4'), 128,1 (C-1''), 127,8 (C5''), 127,3 (C-2', C-6'), 120,7 (C-3'), 115,8 (C-4''), 108,6 (C-6), 95,9 (C-8), 80,4 (C2), 44,3 (C-3), 22,4 (C-11).



Esquema 4.4: Estudo da fração O: obtenção dos compostos 2.3, 2.6 e 2.8.

4.2.5. Estudo da Fração N.

A fração N (8,49 g) foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna com 43 g, eluída com misturas de *n*-hexano/EtOAc (fluxo de 15mL/min, λ 254 e 215 nm). Após a análise por TLC, as frações recolhidas foram associadas de acordo com o seu perfil cromatográfico (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Cromatografia da fração N.

Frações	eluente	Relação v/v	Massa (g)
N ₁	<i>n</i> -hex/EtOAc	30:70	0,103
N ₂	<i>n</i> -hex /EtOAc	40:60	0,122
N ₃	<i>n</i> -hex /EtOAc	50:50	0,508
N ₄	<i>n</i> -hex /EtOAc	50:50	0,429
N ₅	<i>n</i> -hex /EtOAc	60:40	3,52
N ₆	<i>n</i> -hex /EtOAc	70:30	1,037
N ₇	<i>n</i> -hex /EtOAc	80:20	0,356
N ₈	<i>n</i> -hex /EtOAc	90:10	0,414

4.2.5.1. Estudo da fração N₅

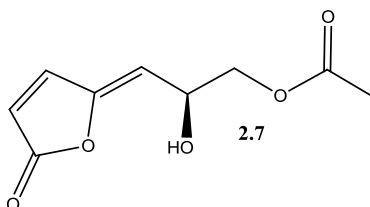
A fração N₅ (3,52 g, cf Tabela 4.5) foi cromatografada numa coluna com 180 g de sílica usando como eluentes misturas de *n*-hexano/EtOAc de polaridade crescente (100:0 a 0:100, gradiente de 10%; porções de 400 mL) e EtOAc/ MeOH (100: 30, 800 mL). Após análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas de acordo com o seu perfil cromatográfico e conforme indicado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Cromatografia da fração N₅.

Frações	Eluente	Relação v/v	Massa (g)
N _{5A}	Hex/EtOAc	40:60	0,030
N _{5B}	Hex/EtOAc	50:50	2,60
N _{5C}	Hex/EtOAc	60:40	0,403
N _{5D}	Hex/EtOAc	80:20	0,126

4.2.5.2. Estudo da fração N_{5B}

A fração N_{5B} (2,60 g, cf Tabela 4.6) foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna de 43 g RP18 de fase reversa, com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10 mL/min, λ 254 e 215 nm). Após análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas, obtendo-se uma fração principal N_{5B1} (0,480 g). A fração N_{5B1} foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna de 43 g C-18 de fase reversa, com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10 mL/min, λ 254 e 215 nm). Após cromatografia, as frações foram recolhidas e associadas, verificando que a fração N_{5B1} (**51mg**) (MeOH/CH₂Cl₂ 1:99) era constituída por um composto puro, que foi identificado como sendo o cleistonol (**2.7**)



Cleistonol (**2.7**)

Óleo amarelado

Rf: 0,2 CH₂Cl₂/MeOH (99:1)

($[\alpha]_D^{22} = +27,6$ (CHCl₃, c 0,0013).

ESI-MS : m/z 221 $[M + Na]^+$, 149, 117, 101.

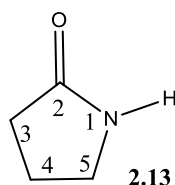
IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3382, 1750, 1720, 1375, 1242, 1115.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (1H, *d*, $J = 5,5$ Hz, H-4), 6,35 (1H, *d*, $J = 5,5$ Hz, H-3), 5,44 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-6), 4,85 (1H, *m*, H-7), 4,14 (1H, *m*, H-8 α), 3,73 (1H, *m*, H-8 β).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,6 (C-10), 171,0 (C-2), 151,5 (C-5), 145,8 (C-4), 121,5 (C-3), 114,9 (C6), 67,8 (C-8), 65,5 (C-7), 20,6 (C-11).

4.2.5.3. Estudo da fração N₆

A fração N₆ (1,037 g) foi cromatografada utilizando um sistema automático combiflash com uma coluna de 43 g RP18 de fase reversa, eluída com misturas de H₂O/MeOH (fluxo de 10mL/min, λ 254 e 215 nm). Após a análise por c.c.f, as frações recolhidas foram associadas, obtendo-se a fração N_{6A} (65 mg) correspondente a um composto puro, que após análise espectroscópica foi identificado como sendo a **butirolactama (2.13)**.



Butirolactama (2.13)

Rf: 0,42 *n*-hexano/EtOAc (20:80)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (KBr): 3378, 1730, 1585, 1384

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,17 (1H, *s*, NH), 3,82 (2H, *m*, H- 5), 2,59 (2H, *m*, H-3), 2,01 (2H, *m*, H-4)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 177,1 (C-2), 45,4 (C-5), 33,2 (C-3), 16,9 (C-4).

4.3. Avaliação da atividade antibacteriana

4.3.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Estirpes bacterianas

As amostras foram testadas nas seguintes estirpes de *Staphylococcus aureus*: uma estirpe sensível *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (MSSA); duas estirpes resistentes à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 43866 e *Staphylococcus aureus* ATCC 9144; duas estirpes com resistência intermédia a vancomicina (VISA), *Staphylococcus aureus* CIP 106706 e *Staphylococcus aureus* CIP 106414 e no *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228; e nas estirpes *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Determinação dos valores de CMI

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos compostos isolados determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI), que corresponde à menor concentração de amostra que inibe o crescimento bacteriano. Recorreu-se à técnica de diluição em meio líquido – micrométodo, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; 2012).

Os compostos testados [isolados (2.1-2.13) e derivados de síntese da dichamanetina (2.16-2.26)] foram dissolvidos numa mistura de DMSO/ meio Mueller-Hinton (1:9) obtendo-se uma solução de 1mg /mL e ensaiados numa gama de concentrações entre 0,49-500 µg/mL. De um modo muito resumido, ao meio de *Mueller-Hinton* líquido (100 µL) adicionaram-se 100 µL da solução da amostra a testar. Procedeu-se à diluição sucessiva e posterior adição, a cada poço, de um inóculo da bactéria (10 µL, concentração final de 10^4 cfu/mL). Em cada placa incluiu-se um branco de solvente e de bactéria. As placas foram incubadas durante um período de 24 h a 37 °C, sendo o crescimento bacteriano avaliado pela medição da densidade óptica dos poços a 630 nm num espectrofotómetro Biotek ELX 808. Esta leitura foi sempre confirmada pela observação macroscópica das placas. Os antibióticos amoxicilina, oxacilina e vancomicina foram usados como controlos positivos.

4.3.2. Determinação do índice da concentração inibitória fracional (FICI)

O efeito da combinação dos compostos e os antibióticos de referência foi avaliado pelo método do *checkerboard* nas estirpes *S. aureus* sensível (MSSA) ATCC 6538, resistentes ATCC 9144 (MRSA) e nas estirpes com resistência intermédia a vancomicina CIP 106414.

As amostras foram dissolvidas em solventes apropriados (DMSO) e preparadas soluções com concentrações correspondente a 2 vezes a CMI. As soluções dos antibióticos foram preparadas em água destilada esterilizada com concentrações correspondentes a quatro vezes a CMI do antibiótico para cada uma das três estirpes estudadas. Deste modo ao meio Muller-Hinton (50 µL por célula, na placa de microtitulação), adicionaram-se 50 µL da solução do antibiótico de referência a testar, na primeira linha horizontal da placa. De seguida, com uma pipeta multi-canal, procedeu-se a diluições sucessivas, nas respetivas linhas verticais. Por fim, adicionaram-se a cada poço 50 µL da amostra a testar e mais 10 µL de um inóculo da bactéria. Em cada placa, incluiu-se um branco de solvente e de bactéria. As placas foram incubadas durante um período de 24 h a 37 °C. A interação dos compostos com os antibióticos foi avaliada utilizando uma gama de concentrações de composto entre o valor 1 a 1/64 da CMI e do antibiótico entre 1 a 1/1024 da CMI.

O efeito combinatório foi determinado baseado no valor do índice de concentração mínima inibitória fracional (FICI) que é calculado de acordo com a seguinte fórmula: $FICI = FIC(\text{composto}) + FIC(\text{antibiótico})$ onde, $FIC(\text{composto}) = CMI \text{ do composto na presença do antibiótico} / CMI \text{ do composto sozinho}$ e $FIC(\text{antibiótico}) = CMI \text{ do antibiótico na presença do composto} / CMI \text{ do antibiótico sozinho}$.

Ocorre efeito sinérgico quando FICI é igual ou inferior a 0,5. Se FICI se encontra entre 0,5 e 4,0, não ocorre interação entre o composto e o antibiótico, e quando o valor de FICI é maior que 4 ocorre um efeito antagonista.

4.4. Avaliação da atividade antifúngica

Espécies fúngicas

As amostras foram testadas nas seguintes espécies de fungos: *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* FFUL 12B, *Candida dubliniensis* FFUL 21, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilopsisi* ATCC

90018, *Cryptococcus neoformans* FFUL 948, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Geotrichum*, *Rhodotomula rubra* FFUL 190, e *Trichosporon cutaneum* FFUL 18H e *Saccharomyces cerevisiae* FFUL 1997.

Compostos testados

Foram preparadas soluções de 1 mg/mL dos compostos: pinostrobin (2.1), dichamanetina (2.2), isochamanetina (2.3), cicloexeno (2.5), (R)-(E)- acetilmelodrinol (2.6), snome(2.7)-, cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (2.9), 24-metilenocicloartanol (2.10), β -sitostenona (2.11), butirolactama (2.13), chamanetina(2.21) e cleistenolido (2.22).

4.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória

Para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos isolados determinou-se pela concentração mínima inibitória (CMI), que corresponde à menor concentração de amostra que inibe o crescimento fúngico. Recorreu-se à técnica de diluição em meio líquido – micrométodo, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; 2012).

Os compostos testados foram dissolvidos numa mistura de DMSO/ meio *Mueller-Hinton* + glicose (1:9) obtendo-se uma solução de 1mg/mL e ensaiados numa gama de concentrações entre 0,49-500 μ g/mL. De um modo muito resumido, ao meio de *Mueller-Hinton*+ glicose (100 μ L) adicionaram-se 100 μ L da solução da amostra a testar. Procedeu-se à diluição sucessiva e posterior adição, a cada poço, de um inóculo do fungo (10 μ L, concentração final de 10^4 cfu/mL).

Em cada placa incluiu-se um branco de solvente e de fungo. As placas foram incubadas durante um período entre 24 a -48 h a 30 °C, sendo o crescimento fúngico avaliado pela medição da densidade optica dos poços a 630 nm num espectrofotómetro Biotek ELX 808. Esta leitura foi sempre confirmada pela observação macroscópica das placas.

CAPÍTULO 5

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- Abdelwahab, S. I., Mohan S., Abdulla, M. A., Sukari, M. A., Abdul, A. B., Taha, M. M. E., Syam, S., Ahmad, S., Lee, K-H., 2011. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(2), 963–970.
- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simões, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 29, 1007–1021.
- Achenbach H., Horn, M., Waibel R., Nkunya H. H. M., Jonker, S. A., Muhie, S., 1997. Oxygenated Pyrenes, their Potencial Biosynthetic precursor and Benzylated Dihydroflavones from two african UVARIA SPECIES. *Phytochemistry*, 44(2), 359–364.
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2015. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, 22(2), 245–55.
- Alias, A., Hazni, H., Jaafar, F. M., Awang, K., Ismail, N. H., 2010. Alkaloids from, *Fissistigma latifolium*. *Molecules*, 15, 4583–4588.
- Aminimoghadamfarouj, N., Nematollahi, A., Wiart, C., 2011. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. *Journal of Asian natural products research*, 13(5), 465–76.
- Appelbaum, P. C., 2007. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases*, 45 Suppl 3, S165–70.
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435–57.
- Baptista, R., Madureira, A. M., Jorge, R., Adão, R., Duarte, A., Duarte, N., Lopes, M. M., Teixeira, G., 2015. Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native

- Lavandula Species from Portugal. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015, 1-10.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M-C., Barrachina, I., Estornell. E., Cortes, D., 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Reports*, 22, 269–303.
- Bruschi, P., Morganti, M., Mancini, M., Signorini, M. A., 2011. Traditional healers and laypeople: a qualitative and quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda (Mozambique). *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 543–63.
- Chanakul, W., Tuchinda, P., Anantachoke, N., Pohmakotr, M., Piyachaturawat, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Jaipetch, T., Nuntasaen, N., Reutrakul, V., 2011. Cytotoxic alkaloids from stems, leaves and twigs of *Dasymaschalon blumei*. *Fitoterapia*, 82(7), 964–8.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K. Chase, M. W., 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of Linnean Society*, 5–40.
- Chaves, M. H., Barbosa, A. S., Neto, M. M. J., 2004. Caracterização Química do Óleo da Amêndos de *Sterculia striata* ST. HIL. ET NAUD. *Quimica Nova*, 27(3), 404–408.
- Chan, H-H., Hwang, T-L., Thang, T. D., Leu, Y-L., Kuo, P-C., Nguyet, B. T. M., Dai, D. N., Wu, T.-S. (2013). Isolation and Synthesis of Melodamide A , a New Anti-inflammatory Phenolic Amide from the Leaves of *Melodorum fruticosum*. *Planta Med*, 79, 288–294.
- Chen, Z., Liu, Y.-L., Xu, Q.-M., Liu, J.-Y., Duan, H.-Q., Yang, S.-L., 2013. New polyoxygenated cyclohexene and polyoxygenated seco-cyclohexene from *Uvaria boniana*. *Journal of Asian natural products research*, 15(1), 53–8.

- Chen, J., Li, W., Yao, H., Xu, J., 2015. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*, 103, 231–241.
- Chung, P. Y., Navaratnam, P., Chung, L. Y., 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 10(1), 25.
- Clardy, J.; Fischbach, M. A., Walsh, C., 2006. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Natural Biotechnology*, 24, 1541–1550.
- CLSI, 2012 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* 106(3), 290-302.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(6), 3670–95.
- Dai, Y., Harinantenaina, L., Brodie, P. J., Callmander, M. W., Randrianaivo R., Rakotonandrasana, S., Rakotobe, E., Rasamison, V. E., Yongchun S., 2011. Antiproliferative Acetogenins from a *Uvaria* sp. from the Madagascar Dry Forest . *Journal of natural products*, 75, 479-483.
- ^aDewick, P. M., 2009. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In *Medicinal Natural products: a biosynthetic approach*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd.pp 7-38.
- ^bDewick, P. M., 2009. Alkaloids. In *Medicinal Natural products: a biosynthetic approach*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd.pp 311-417.
- ^cDewick, P. M., 2009. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In *Medicinal Natural products: a biosynthetic approach*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd.pp 135-184.

- Do Nascimento, R. F., De Sales, I. R. P., Formiga, R. O. , Barbosa-Filho, J. M., Sobral, M. V., Tavares, J. F., Diniz, M. D. F. F. M., Batista, M. L., 2015. Activity of alkaloids on peptic ulcer: what's new? *Molecules*, 20(1), 929–50.
- Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M., Jabes, D., 2010. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of Antibiotics*, 63(8), 423–430.
- Emmons, G. T., Wilson, W. K., Schroepfer, G. J. (1989). H-1 and C-13 NMR assignments for Lanostan-3 β -ol derivatives – revised assignments for lanosterol. *Magnetic Resonance in Chemistry* 27(11), 1012-1024.
- Ferreira, W.F.C., Sousa J.C.F., Lima N., 2010. Microbiologia. Lidel Ed., Lisboa.
- Comer, F., Tiwari, H. P., Spencer, I. D., 1969. Biosynthesis of aristolochic acid1. *Canadian Journal of Chemistry*, 47, 481-487.
- Gardete, S., Tomasz, A., 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 481-487.
- Ge, Y-W., Zhu, S., Shang, M-Y., Zang, X-Y., Wang, X., Bai, Y-J., Li, L., Konatsu, K., Cai, S-Q., 2013. Aristololactams and aporphines from the stems of *Fissistigma oldhamii* (Annonaceae), *Phytochemistry* 86(6), 201–207.
- Georgopapadakou, N. H., 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Antimicrobials*, 1, 547–557.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Products Reports*, 21, 263-277.
- Greca M. D, Monaco P., Previtera L., 1990. Stigmasterols from *Thypha latifolia*. *Journal of Natural Product*, 53, 1430-1435.
- Global Plants, 2015. *Cleistochlamys kirkii* Benth. Oliv. [family Annonaceae]. Disponível em: <https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.flora.fz252>

- Hamonniere, M., Fournet, A., Leboeuf, M., Bouquet, A., Cave, A. (1976). Polycarpol, a new triterpene from *Polyalthia oliveri* engl and *Meiocarpidium lepidotum* engl ang diels, Annonaceae. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie C* 282 (22), 1045-1047
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639–52.
- Hill, R. A., Connolly, J. D. , 2012. Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 29(7), 780-818.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A, Baba, T., 2014. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of infection and chemotherapy* 20(10), 593–601.
- Hwang, T-L., Li, G-L., Lan, Y-H., Chia, Y-C., Hsieh, P-W., 2009. Potent inhibition of superoxide anion production in activated human neutrophils by isopedicin , a bioactive component of the Chinese medicinal herb *Fissistigma oldhamii*. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(4), 520–528.
- Ichimaru, M., Nakatani, N., Mariyasu, M., Nishiyama, Y., Kato, A., Mathenge, S. G., Juma, D. F., Mutiso, C. P. B., 2010. Hydroxyespintanol and schefflerichalcone: two new compounds from *Uvaria scheffleri*. *Journal of natural Med*, 64, 75–79.
- Ji, H-F., Li, X-J, Zhang, H-Y., 2009. Natural products and drug discovery. *European Molecular Biology Organizatin*, 10, 195–199.
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Schram, K. H., Cole, J. R., Tempesta, M. S., Bates, R. B., 1981. Structures of Zeylenol and Zeylena, Constituents of *Uvaria zeylancia*. *Journal of Organic. Chemistry*, 46(21), 4267–4272.
- Jung, J. H.; Pummangura, S.; Chaichantipyuth, C.; Patarapanich, C.; Fanwick, P. E.; Chang, C.; Mclaughlin, J. L., 1990. New bioactive heptenes from *melodorum fruticosum* (annonaceae). *Tetrahedron*, 46, 5043–5054.

- Kaweetripob, W., Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., 2015. Cyclohexene long-chain fatty acid esters from *Uvaria dulcis* (Dunal). *Phytochemistry Letters*, 12, 248–251.
- Khabbaz, R. F., Moseley, R. R., Steiner, R. J., Levitt, A. M., Bell, B. P., 2014. Challenges of infectious diseases in the USA. *The Lancet (London, England)*, 384(9937), 53–63.
- Khazir, J., Mir, B. A., Mir, S. A., Cowan, D., 2013. Natural products as lead compounds in drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, 15(7), 764–788.
- Kongstad, K. T., Wubshet, S. G., Kjellerup, L., Winther, A.-M. L., Staerk, D., 2015. Fungal plasma membrane H⁺-ATPase inhibitory activity of o-hydroxybenzylated flavanones and chalcones from *Uvaria chamae* P. Beauv. *Fitoterapia*, 105, 102–6.
- Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K., Aqil, M., 2001. Bianthraquinones from *Cassia siamea*. *Phytochemistry*, 56, 849–851.
- Kumar, V., Prasad, A. K., & Parmar, V. S., 2003. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Natural Product Reports*, 20(6), 565.
- Lan, Y-H., Peng, Y-T., Thang, T-D., Hwang, T-L., Dai, D-N., Leu, Y-L., Lai, W-C., Wu, Y-C., 2012. New Flavan and Benzil Isolated from *Fissistigma latifolium*. *Chem. Pharm.Bull*, 60(2), 280–282.
- Lan, Y-H., Leu, Y-L., Peng Y-T., Thang, T-D., Lin C-C., Bao, B-Y., 2011. The First Bis-Retrochalcone from *Fissistigma latifolium*. *Planta Med*, 77, 2019-2022.
- Li, H. Y., Sun, N. J., Kashiwada, Y., Sun, L., Snider, J. V., Cosentino, L. M., Lee, K. H., 1993. Anti-AIDS agents . Suberosol, a new C31 Lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia-Suberosa*. *Journal of Natural Products* 56(7), 1130-1133.
- Livermore, D. M., 2011. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 1941–1944.

- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance : the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273.
- Madureira, A. M., 2004. Metabolitos secundários de *Euphorbia segetalis* L. e *Euphorbia portlandica* L.: caracterização estrutural e avaliação da actividade biológica
- Mahmood, T., Roy, S., Siddiqui, H. H., Shamim, A., 2015. Antibiotics Resistance : A Silent Global Threat, 4(02), 1177–1197.
- Malebo, H. M., Wenzler, T., Cal, M., Swaleh, S. M., Omolo, M. O., Hassanali, A., Séquin, U., Hausenger, D., Dalgaard, P., Hamburger, M., Brun, R., Ndiege, I., 2013. Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 48.
- Melendez-Camargo M. E., Contreras-León, I., Silva Torres, R., 2014. Diuretic effect of alkaloids fraction extracted from *Selaginella lepidophylla* (Hook . et Grev .) Spring. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13, 92–99.
- Minami, H., Kim, J-S., Ikezawa, N., Takemura, T., Katayama, T., Kumagai, H., Sato, F. (2008). Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *PNAS*, 105(21), 7393–7398.
- Monteiro, A., 2014. Actividade Antibacteriana dos Constituintes Químicos da Planta Medicinal Africana *Cleistochlamys kirkii*.
- Molinspiration, Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> (Novembro, 2015).
- Motoyama, T., Yabunaka, H., & Miyoshi, H. (2002). Essential Structural Factors of Acetogenins , Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12, 2089–2092.

- Nguyen, N. T., Pham, V. C., Litaudon, M., Guéritte, F., Grellier, P., Nguyen, T. V., Nguyen, V. H., 2008. Antiplasmodial Alkaloids from *Desmos rostrata*. *Journal of Natural Product*, 4(5), 2057–2059.
- Nguyen, N. T., Phan, C. V., Litaudon, M., Guéritte, F., Bodo, B., Nguyen, T. V., Nguyen, H. V., 2009. Novel cyclopeptide and unique flavone from *Desmos rostrata*. Total synthesis of desmorostratone. *Tetrahedron*, 65, 7171–7176.
- Nkunya, M. H. H., 2005. Unusual metabolites from some Tanzanian indigenous plant species. *Pure and Applied Chemistry*, 77(11), 1943–1955.
- Nucci, M., Marr, K. A. (2005). Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious diseases*, 41, 521–526.
- Nyandoro, S. S., 2014. Some rare Tanzanian plant species as sources of less common metabolites: biomedical potential and conservation status. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2), 147–157.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272–279.
- Paiva D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., 2001. Infrared Spectroscopy. In *Introduction to Spectroscopy*, 3rd Edition, Thomson Learning, Inc. Thomson. pp 13-101.
- Palmeira Júnior, F. S., Alves, L. V., Moura S. F., Vieira, F. A. L., Conserva, L. M., Lemos, R. P. L., 2006. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(3), 397–402.
- Macabeo, P. A., Tudla, G., F. A., Alejandro, J. G.D., Kouam, S. F., Hussain, H., Krohn, K., 2010. Benzoylated derivatives from *Uvaria rufa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 857–860.
- Peacock, S. J., Paterson, G. K., 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*, 84, 577–601.
- Pereira, F., Madureira, A. M., Sancha, S., Mulhovo, S. Luo, X., Duarte, A., Ferreira, M-J. U., 2016. *Cleistochlamys kirkii* chemical constituents: Antibacterial activity

- and synergistic effects against resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Ethnopharmacology*, 178,180-187.
- Prawat, U., Chairerk, O., Lenthas, R., Salae, A-W., Tuntiwachwuttikul, P., 2013. Phytochemistry Letters Two new cycloartane-type triterpenoids and one new flavanone from the leaves of *Dasymaschalon dasymaschalum* and their biological activity. *Phytochemistry Letters*, 6(2), 286–290.
- Prawat, U., Chairerk, O., & Phupornprasert, U., Salae, A-W., Tuntiwachwuttikul, P., 2013. Two New C-benzylated Dihydro- chalcone Derivatives from the Leaves of *Melodorum siamensis*. *Planta Med*, 79, 83–86.
- Prawat, U., Phupornprasert, D., Butsuri, A., Salae, A-W., Boonsri, S., 2012. Flavonoids from *Friesodielsia discolor*. *Phytochemistry Letters*, 5(4), 809–813.
- Ramesh, P., Meshram, H. M., 2011. Total synthesis of (-) -cleistenolide. *Tetrahedron Letters*, 52(19), 2443–2445.
- Ribarič, S., 2012. The pharmacological properties and therapeutic use of apomorphine. *Molecules*, 17(5), 5289–309.
- Rittiwong, T., Mutarapat, T., Ponglimanont, C., Mahabusarakam, W., 2011. Saiyutones A-D : Four new unusual biflavones from *Desmos chinensis*. *Tetrahedron*, 67(30), 5444–5449.
- Rosandy, A. R., Din, L. B., Yaacob, W. A., Yusoff, N. I., Sahidin, I., Latip, J., Nataqain, S., Noor. M. N. (2013). Isolation and Characterization of Compounds From the Stem Bark of *Uvaria Rufa* (Annonaceae). *The Malaysian Journal of Analytical Sciencies*, 17(1), 50–58.
- Samwel, S., Mdachi, Stephen J. M., Nkunya, M. H. H., Irungu, B. N., Moshi, M. J., Moulton, B., Luisi, B. S., 2007. Cleistenolide and cleistodienol: Novel bioactive constituents of *cleistochlamys kirkii*. *Natural Product Communications* 2(7): 737-741.

- Sato, F., Kumagai, H., 2013. Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 89(5), 165–182.
- Shen, C. C., Chou, S. C., Chou, C. J., Ho, L. K. (1996). Total synthesis of acetylmelodorinol. *Tetrahedron-Asymmetry* 7(11): 3141-3146.
- Silverstain, R. M., Webster, F. X., 1998. Infrared Spectrometry. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Edition, John Wiley & Sons, Inc. pp 77-143.
- Smetanina, O. F., Kalinovskii, A. I., Khudyakova, Y. V., Slinkina, N. N., Pivkin, M. V, « Kuznetsova, T. A., 2007. Metabolites from the Marine Fungos. *Eurotium repens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 327–329.
- Sousa, M. A. De., 2012. Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA): um pesadelo para a saúde pública. *Revista de Ciências da Saúde da ESSCVP*, 4, 19–30.
- Starks, C. M., Williams, R. B., Rice, S. M., Norman, V. L., Lawrence, J. A., Goering, M. G., O'Neil-johnson, M. O., Hu, J-F., 2012. Polyoxygenated cyclohexene derivatives from *Monanthotaxis congoensis*. *Phytochemistry*, 74, 185–189.
- Takeuchi Y., Cheng Q., Shi W-Q., Sugiyama, T., Oritami, T., 2001. Four polyoxygenated cyclohexenes from the Chinese Tree, *Uvaria Purpurea*. *Biosci. Biotechnol, Biochem*, 65(6), 1395-1398.
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 65, 225-257
- Thuy, T. T. T., Quan, T. D., Anh, N. T. H., Sung, T. V., 2012. Cytotoxic and antimicrobial aporphine alkaloids from *Fissistigma poilanei* (Annonaceae) collected in Vietnam. *Natural product research*, 26(14), 1296–302.
- Thwaites, G. E., Gant, V., 2011. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nature reviews. Microbiology*, 9(3), 215–22.

- Tohme, R., Darwiche, N., Gali-Muhtasib, H., 2011. A journey under the sea: the quest for marine anti-cancer alkaloids. *Molecules*, 16(11), 9665–96.
- Urgaonkar, S., Pierre, H. S. La Pierre, S. H., Meir, I., Lund, H., RayChaudhuri, D., Shaw, J. T. 2005. Synthesis of Antimicrobial Natural Products Targeting FtsZ: *Organic Letters*, 7(25), 5609–5612.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110.
- Weston, L. A, Mathesius, U., 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 283–297.
- WHO, 2015. Antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- Winkel-shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Planta Biology*, 5, 218–223.
- Wu, C., Kim, H. K., Wezel, G. P., Choi, Y. H., 2015. Metabolomics in the natural products field – a gateway to novel antibiotics. *Drug Discovery Today: Technologies*.
- Wu, C.-S., Lin, Z.-M., Wang, L.-N., Guo, D.-X., Wang, S.-Q., Liu, Y.-Q., Yuan, H.-Q., Lou, H.-X., 2011. Phenolic compounds with NF- κ B inhibitory effects from the fungus *Phellinus baumii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(11), 3261–7.
- Wu, Y-C., Sureshbabu, M., Fang, Y-C., Wu, Y-H., Lan, Y-H., Chang, F-R., Chang, Y-W., Hwang, T. L., 2013. Potent inhibition of human neutrophil activations by bractelactone , a novel chalcone from *Fissistigma bracteolatum*. *Toxicology and Applied Pharmacognosy*, 266, 399–407.
- Xiao-Lei, Z., Jiu-hong, W., Jiao, B., Xiao-Lan, H., En-zhen, L., Ning, S., Yue-hu, P., 2013. A new aristolactam alkaloid from the stems of *Dasymaschalon trichophorum*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1), 81–83.

- Xie, Y.X., Yang, W.J., Tang, F., Chen, X.Q., Ren, L.C., 2015. Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism. *Curr. Med. Chem.* 22, 132–149.
- Yang, X.-N., Jin, Y.-S., Zhu, P., Chen, H.-S., 2010. Amides from *Uvaria microcarpa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(2), 270–271.
- Ching, Y. A., Wah, T. S., Sukari, M. A., Lian, C. G., 2007. Characterization of Flavanoid Derivatives from *Boesenbergia Rotunda (L)*. *The Malaysian Journal of Analitical Sciences*, 11(1), 154–159.
- Yong Y. , Matthew S., Wittwer J., Pan L., Shen Q., Kinghorn A. D., Swanson, M. S., Blanco, D. C. J. E., 2013. Dichamanetin Inhibitors Cancer Cell by Affecting ROS-related Signaling through Mitochondrial-mediated Apoptosis. *Anticancer research*, 33(12), 5349–5355.
- Zafra-Polo, M. C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J. R., Cortes, D., 1998. Natural Acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action, *Phytochemistry*, 48, 1087–1117.
- Zhang, Y.-N., Zhong, X.-G., Zheng, Z.-P., Hu, X.-D., Zuo, J.-P., Hu, L.-H., 2007. Discovery and synthesis of new immunosuppressive alkaloids from the stem of *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(2),
- Zhou, G., Chen, R., Yu, D., 2011. Uvacalols I, J and K: new polyoxygenated cyclohexenes with all trans relative configurations from the roots of *Uvaria calamistrata* Hance. *Natural Product Research*, 25(2), 161–8.
- Zhou, G.-X., Zhang, Y.-J., Chen, R.-Y., Yu, D.-Q, 2010. Three polyoxygenated cyclohexenes from *Uvaria calamistrata*. *Journal of Asian natural products Research*, 12(8), 696–701.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., Pinto, E., Salgueiro, L., 2012. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food chemistry*, 135(3), 1505–10.

.